VITOR BASSO SCHUL

Partículas de Fosfato de Ferro e Fosfato de Ferro-Cálcio
como dispositivos visando o tratamento de melanoma

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Bioengenharia

Orientador:

Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos,
2010

Class.	TESE ✓
Cutt.	7783
Tombo	T0041/11
Sysno	2159701

150311

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

S386p Schul, Vitor Basso
Partículas de fosfato de ferro e fosfato de ferro-cálcio como dispositivos visando o tratamento de melanoma / Vitor Basso Schul ; orientadora Ana Maria de Guzzi Plepis. -- São Carlos, 2010.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

1. Melanoma - tratamento térmico. 2. Laser. 3. Câncer.
Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

VITOR BASSO SCHUL
MESTRADO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC – FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 07/10/2010

PROFA. DRA. ANA MARIA DE GUZZI
PLEPIS (ORIENTADORA)

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: aprovado

Assinatura: Ana Maria Plepis

PROF. DR. OSCAR PEITL FILHO

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Resultado: aprovado

Assinatura: Oscar Peitl Filho

PROF. DR. ORIVALDO LOPES DA SILVA

Escola de Engenharia de São Carlos – USP

Resultado: aprovado

Assinatura: Orivaldo L.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, por ter aceitado o desafio de me auxiliar na elaboração e execução deste trabalho, pela compreensão, paciência e por todo conhecimento transmitido.

A Astréa, pela dedicação, pelo carinho, pela compreensão e, também, por todo apoio e incentivo dados durante a elaboração deste trabalho.

A profa. Dra. Alessandra Cecchini Armani do Departamento de Patologia da Universidade Estadual de Londrina, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, por estar sempre disposta a ajudar, e, principalmente, pela amizade e carinho.

Aos amigos feitos durante o mestrado, que estiveram presentes nos momentos alegres e, principalmente, nos difíceis. Pelas experiências vividas, os churrascos, os almoços, os jantares e aos momentos lúdicos na frente do vídeo game: Alessandro, Uziel, Gabi, Jaque, Léo, Ipólito, Ana, Vivi, Tati e todos os demais que ficaram para sempre no meu coração.

Ao Prof. Oscar Peitl, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Pelas idéias compartilhadas, pelas conversas, por toda disposição, todo empenho, toda ajuda e pela parceria formada.

Ao Gustavo De Paula, por toda ajuda e disposição para a produção e caracterização dos vidros.

A Cláudia, por me ajudar no trabalho com o cultivo e tratamento celulares, por sempre ter me auxiliado nos momentos que precisei. E a Dra. Janice Rodrigues Perussi, pela colaboração, incentivo e atenção dada ao trabalho.

A Bianca Machado Cerrutti e a Dra. Elisabete Frolline do laboratório de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Tomaz Catunda do Grupo de Espectroscopia de Sólidos do Instituto de Física de São Carlos – USP.

Aos meus amigos e irmãos, Bruno, Thiago e Padero, por serem meus grandes irmãos e amigos. Vocês moram no meu coração.

A CAPES, pela bolsa de estudos proporcionada para auxiliar a realização do trabalho.

Resumo

SCHUL, V. B. **Partículas de Fosfato de Ferro e Fosfato de Ferro-Cálcio como dispositivos visando o tratamento de melanoma.** 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

O câncer tem múltiplas origens e suas causas incluem estilo de vida, fatores ambientais e suscetibilidade genética hereditária. Por isso, a busca por tratamentos mais eficazes e por um diagnóstico precoce das neoplasias malignas cresce cada vez mais. Apesar de o câncer, geralmente, derivar de um único clone de células transformadas, o processo de progressão tumoral promove considerável diversidade genética entre as células neoplásicas em crescimento. O Melanoma cutâneo maligno origina-se dos melanócitos presentes predominantemente na pele ou de células precursoras multipotentes, como os nevus, e é o câncer cutâneo com maior grau de malignidade. Várias são as linhas de tratamento utilizadas atualmente para o câncer, porém muitas ainda não são tão eficazes, e a descoberta precoce ainda é uma das principais ferramentas para o combate ao problema. O presente projeto teve como objetivo verificar a resposta de células de fibroblastos e Hep2 *in vitro* tratadas com partículas de Óxido de Ferro e Ferro-Cálcio, assim como, a caracterização dessas partículas. A caracterização das partículas foi realizada por meio da análise granulométrica, de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), teste de absorbância dos vidros e a medida da capacidade de aquecimento das partículas quando em solução nas concentrações de 50, 250 e 500mg/ml. Os testes de toxicidade dos vidros foram realizados por meio de ensaios *in vitro* de difusão de extratos em solução e método de difusão em Agar utilizando-se linhagem celular de fibroblasto e células tumorais de laringe humana hep2. E, testes *in vivo* com a administração das partículas obtidas pela via subcutânea. Os resultados da caracterização das partículas demonstraram que o diâmetro médio das partículas de fosfato de ferro foi de 830,2nm e 745,3nm para as partículas de fosfato de ferro-cálcio, o que foi confirmado pela MEV. O teste de absorbância mostrou que os vidros absorvem em ampla faixa do espectro eletromagnético, incluindo a faixa de 660nm. O teste de aquecimento demonstrou a capacidade das partículas em variar em média 14°C a temperatura da solução, independentemente da concentração utilizada. Os testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que as partículas não foram citotóxicas e não causaram danos ao tecido subcutâneo, mesmo após o tempo de 1 semana da administração. Estes resultados mostram que a utilização de partículas de vidros de fosfato para o tratamento de câncer pode ser viável, assim com seu potencial para utilização no tratamento de melanoma.

Palavras-chave: Melanoma. Tratamento Hipertérmico. Laserterapia. Câncer.

Abstract

SCHUL, V. B. **Partículas de Fosfato de Ferro e Fosfato de Ferro-Cálcio como dispositivos visando o tratamento de melanoma.** 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Cancer has many origins and their causes include lifestyle, environmental factors and hereditary susceptibility. Therefore, the search for better treatments and early diagnosis of malignant neoplasms grows more and more. Although the cancer usually derives from a single clone of transformed cells, the process of tumor progression promotes genetic diversity between the neoplastic cells in growth. Cutaneous Malignant Melanoma arises from melanocytes predominantly present in the skin or multipotent progenitor cells, such as nevi, and is the skin cancer with the highest degree of malignancy. Several lines of treatment are currently used to treat the cancer, but many still not effective and early detection stills one of the main tools to combat the problem. This project aimed to verify the response of fibroblasts and Hep2 cells treated *in vitro* with particles of iron oxide and iron-calcium, as well as the characterization of these particles. Characterization of particles was performed by means of textural analysis, scanning electron microscopy (SEM), absorbance test of the glasses and measurement of the heating capability in particle solutions at concentrations of 50, 250 and 500mg/ml. Toxicity tests of glasses were performed using *in vitro* tests of extracts of diffusion in solution and Agar diffusion method using a fibroblast cell line and tumor cells in Hep2 human larynx. And, *in vivo* tests with subcutaneous injection of the particles. The characterization results showed that the particle average diameter of particles of iron phosphate was 830.2 nm and 745.3 nm for the particles of iron-calcium phosphate, which was confirmed by SEM. The absorbance test showed that the glasses absorb in a wide range of the electromagnetic spectrum, including the band of 660nm. The heating test demonstrated the capability of the particles to promote a 14°C average temperature variation in the solution, regardless of the concentration. *In vitro* and *in vivo* tests showed that the particles were not cytotoxic and did not cause damage to the subcutaneous tissue, even after 1 week of administration. These results shows that the utilization of phosphate glasses particles can be feasible, as well as its potential for use in the treatment of melanoma.

Key words: Melanoma. Hipertermic Treatment. Lasertherapy. Cancer.

Lista de Figuras

Figura 1. Melanoma caracterizando as variações na coloração e assimetria. Retirado do World Health Organization Classification of Tumours, 2006.	19
Figura 4. Diferentes arranjos dos tetraedros PO ₄ – Teoria dos Sítios Qn. (retirado de Peng et al, 1991).	27
Figura 2. Tipos mais comuns de grupamentos fosfato: (a) ortofosfato; (b) pirofosfato; (c) metafosfato linear. (retirado de Martin, S.W., 1991).	27
Figura 3. Esquema da estrutura tridimensional do: (a) P ₂ O ₅ puro; (b) com a introdução de cátions modificadores e (c) estrutura tipo polimérica. (retirado de Martin, S.W., 1991).	27
Figura 5. A) Moinho de alta energia; B) Forno utilizado na fusão dos vidros.	39
Figura 6. A) Estufa de CO ₂ ; B) Fluxo laminar utilizado para a manipulação das células.	42
Figura 7. Distribuição granulométrica das partículas de fosfato de ferro.	47
Figura 8. Distribuição granulométrica de partículas de fosfato de ferro-cálcio.	47
Figura 9. Partículas de Fosfato de ferro. Aumento de 1000x.	48
Figura 10. Partículas de Fosfato de ferro. Aumento de 5000x.	49
Figura 11. Partículas de Fosfato de ferro-cálcio. Aumento de 1000x.	49
Figura 12. Partículas de Fosfato de ferro-cálcio. Aumento de 5000x.	50
Figura 13. Absorção de radiação eletromagnética de partículas de fosfato de ferro. A = Absorância e T = Transmitância.	51
Figura 14. Absorção de radiação eletromagnética de partículas de fosfato de ferro-cálcio. A = Absorância e T = Transmitância.	51
Figura 15. Difratoograma de raios-X do vidro de fosfato de ferro.	53
Figura 16. Difratoograma de raios-X do vidro de fosfato de ferro-cálcio.	53
Figura 17. Teste de difusão de extrato em solução dos vidros de FeP e FePCa com células de fibroblastos; CN = Controle Negativo, CP = Controle Positivo.	54
Figura 18. Teste de difusão de extrato em solução dos vidros de FeP e FePCa com células de Hep2; CN = Controle Negativo, CP = Controle Positivo.	55
Figura 19. Placa de teste de difusão de extratos em solução. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo.	55
Figura 20. Teste de difusão em Agar. a) FeP, b) FePCa, c) Controle negativo, d) controle positivo. O círculo e a seta indicam o halo formado devido à morte celular.	56
Figura 21. Teste de difusão em Agar com Hep2. a) FeP, b) FePCa, c) Controle negativo, d) controle positivo. O círculo e a seta indicam o halo formado devido à morte celular.	57
Figura 22. Cortes histológicos do tecido subcutâneo de camundongos tratados com A) Solução salina; ou 1g/mL de partículas de fosfato de ferro em B) 2 horas; C) 24 horas; D) 72 horas; E) 1 semana; F) Detalhe das partículas no tecido (seta vermelha), células polimórficas (P). Aumento de 10x em (A), (B), (C), (D) e (E) e 40x em (F).	59
Figura 23. Cortes histológicos do tecido subcutâneo de camundongos tratados com A) Solução salina; ou 1g/mL de partículas de fosfato de ferro-cálcio em B) 2 horas; C) 24 horas; D) 72 horas; E) 1 semana; F) Detalhe das partículas no tecido (seta vermelha), células polimórficas (P). Aumento de 10x em (A), (B), (C), (D) e (E) e 40x em (F).	60

Lista de Tabelas

Tabela 1 Critérios patológicos para classificação de melanoma (adaptado de Rath, 2006).....	20
Tabela 2: Classificação de Clark para melanoma cutâneo baseado em parâmetros histológicos. (adaptado de Rath, 2006).....	21
Tabela 3: Classificação de Breslow para melanoma cutâneo baseado em parâmetros histológicos. (adaptado de Rath, 2006).	21
Tabela 4: Classificação TNM para melanoma (adaptado de Balch et al., 2001).	22
Tabela 5: Estado de agrupamento para Melanoma Cutâneo (retirado de Balch et al., 2001). .	23
Tabela 6: Propriedades de imunomodulação da hipertermia. Adaptado de Zhang et al, 2008.	35
Tabela 7: Variação de temperatura de partículas de FeP, FePCa e branco (água destilada) em relação as concentrações das partículas em tempo de exposição de 10 min.	52

Lista de Abreviaturas

BRCA1 – Cancer de mama 1

CD44 – Receptor do ácido hialurônico e outros ligantes

CDK4 – Ciclina dependente 4

CDKN2A – Inibidor quinase ciclina dependente 2A

CTC – Células tronco cancerígenas

FeP – Nomenclatura adotada neste trabalho para vidro de fosfato de ferro

FePCa - Nomenclatura adotada neste trabalho para vidro de fosfato de ferro-cálcio

GSTM1 – Gene da Glutathione S-transferase

HSP – Proteína de choque térmico

NK – Natural Killers

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

MSH – Hormônio estimulante de melanócitos

PEG – Polietileno glicol

RNA_m – RNA mensageiro

UV – Radiação eletromagnética ultra-violeta

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	5
Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	7
Lista de Abreviaturas.....	8
CAPITULO I	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
CAPITULO II.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Câncer.....	14
2.2. Melanoma Cutâneo Maligno	18
2.3. Vidros de fosfato	26
CAPITULO III.....	37
3. OBJETIVOS	37
CAPÍTULO IV	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Vidros e Micropartículas	38
4.2. Caracterização das partículas.....	39
4.2.1. Análise Granulométrica	39
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
4.2.3. Propriedades Ópticas	40
4.2.3.1. Absorbância	40
4.2.4. Capacidade de Aquecimento	40
4.2.5. Difração de Raio-X.....	41
4.3. Citotoxicidade.....	41
4.3.1. Cultura celular	41
4.3.2. Obtenção dos extratos.....	42
4.3.3. Difusão de extratos em solução	43
4.3.4. Método de difusão em Agar	43
4.3.5. Animais.....	44
4.3.6. Histopatologia.....	44
CAPITULO V	46
5. RESULTADOS	46
5.1. Vidros e partículas	46
5.1.1. Caracterização das partículas.....	46
5.1.1.1. Análise Granulométrica.....	46
5.1.1.2. Microscopia de Varredura.....	48
5.1.1.3. Propriedades Ópticas.....	50

5.1.1.3.1. Absorbância	50
5.1.1.4. Capacidade de Aquecimento.....	52
5.1.1.5. Difração de Raio-X	52
5.1.1.6. Citotoxicidade	54
5.1.1.6.1. Difusão de extratos em solução	54
5.1.1.6.2. Método de difusão em Agar.....	56
5.1.1.7. Histopatologia	57
CAPITULO VI	61
6. DISCUSSÃO.....	61
CAPÍTULO VII.....	64
7. CONCLUSÃO.....	64
CAPITULO VIII.....	65
8. TRABALHOS FUTUROS	65
CAPÍTULO IX	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO

A busca por tratamentos mais eficazes e por um diagnóstico precoce das neoplasias malignas cresce cada vez mais. A incidência de melanoma cutâneo está aumentando, com uma estimativa de que 1 em 75 pessoas nos Estados Unidos contrairiam a doença no ano 2000 (Lands et al., 1999). Embora o diagnóstico precoce esteja associado a uma alta taxa de cura, 20% dos pacientes diagnosticados morrerão de melanoma cutâneo devido à alta malignidade desta neoplasia (Weyers et al., 1999). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) no Manual de Classificação de Tumores de 2006, o nível de incidência e mortalidade varia consideravelmente no mundo, sendo mais elevado nas populações de predominância Caucasiana e menor nos países onde os habitantes tem origem principal Asiática e Africana.

Fatores familiares e ambientais tem participação na etiologia do melanoma. Os componentes genéticos/familiares incluem tipo de pele, número de nevus, presença de nevus atípico e histórico familiar de câncer de pele. Estes são os fatores de predisposição mais importantes do risco de desenvolver melanoma (LeBoit et al, 2006). A exposição intermitente a radiação UV é o principal fator de risco ambiental para o melanoma, especialmente em combinação com fatores endógenos como pele tipo I e II, sistema imune deficiente e predisposição genética (Armstrog et al, 1993). Nos indivíduos de pele branca a exposição intermitente aos raios UV, principalmente na juventude, mostra-se como fator de risco principal, embora a exposição na vida adulta também tenha sua participação (Veierod et al, 2003).

O aumento da incidência do melanoma é comumente atribuído às mudanças no estilo de vida da população com aumento na exposição intermitente aos raios UV devido à popularização do banho de Sol em praias e piscinas (Dennis et al, 1993; Dennis, L.K. , 1999; Elwood et al, 1998). Outra explicação para o aumento é a depleção da camada de ozônio, a qual protege a superfície do planeta contra os raios UV vindos do espaço (Slaper et al, 1996).

O melanoma maligno é uma neoplasia de pele de alta malignidade, a qual tem um alto potencial metastático mesmo em seu estado inicial e é resistente à quimioterapia e

radioterapia. Vem sendo sugerido que o melanoma maligno não só pode se desenvolver de melanócitos maduros, mas também poderia ser derivado de células tronco prematuras da crista neural (Cramer, S.F., 1991).

O tratamento cirúrgico convencional para tumores sólidos é uma terapia efetiva para a remoção de tumores primários bem definidos, acessíveis e localizados dentro de regiões de tecidos não vitais. No entanto, a alta morbidade e a natureza invasiva associadas à ressecção cirúrgica tornam esta terapia inadequada para o tratamento de metástases pouco definidas, tumores pequenos ou outros tumores localizados dentro de regiões vitais (Hirsch et al., 2003a).

Recentemente, a terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer utilizando substâncias fotossensíveis e lasers vem sendo frequentemente aplicada na medicina clínica (Ohara et al., 2002). Terapias de abrasão térmica podem proporcionar uma alternativa minimamente invasiva para o tratamento cirúrgico convencional de tumores sólidos. Em relação a sua natureza pouco invasiva, procedimentos terapêuticos térmicos são relativamente simples de realizar e, além disso, têm o potencial de melhorar o tempo de recuperação, reduzindo as taxas de complicação e a estadia no hospital. Vários métodos de terapia térmica existem para abrasão local, como laser (Chen et al., 1997; Castren-Persons et al., 1991; Waldow et al., 1988; Philipp et al., 1995), abrasão com micro-ondas e radiofrequência (Seki et al., 1999; Gazelle et al., 2000; Mirza et al., 2001) e ultrassom direcionado (Jolesz et al., 2002) (Hirsch et al., 2003b; O'Neal et al., 2004).

O'Neal et al (2004) introduziram uma nova terapia com laser empregando nanopartículas liberadas sistemicamente chamadas de “nanoshells”. Nanoshells são uma nova classe de nanopartículas compostas de um material dielétrico revestido com uma camada ultrafina de metal (Oldenburg et al., 1999). As nanoshells são compostas de elementos geralmente relacionados como biocompatíveis, como o ouro, um metal inerte bem conhecido por sua biocompatibilidade (Hirsch et al., 2003b). A hipertermia vem sendo utilizada a vários anos para tratar uma ampla variedade de tumores em modelos animais e em pacientes (Ito et al., 2003).

O tratamento utilizando laser pode ocasionar danos no tecido sadio que circunda a área tratada devido à conversão não eficiente da energia do laser em energia térmica (Niemz, M.H., 1996; Lee et al., 1985). Na tentativa de contornar este problema, Tong et al (2002a) desenvolveram um cristal de YAG ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) dopado com íon Neodímio (Nd^{3+}) para ser utilizado como conversor da energia do laser em calor. Fibras ópticas são geralmente

utilizadas para direcionar a energia do laser ao local de aplicação e conversores de energia são fixados na ponta das fibras.

Existem alguns tipos de conversores utilizados nas fibras ópticas, como cápsulas metálicas (Liu et al, 1993) e fibras negras dopadas com carbono (Verdaasdonk et al., 1997), as primeiras tem a desvantagem de se danificarem facilmente durante o uso, as segundas são frágeis e se queimam no ar. As fibras de Nd:YAG são biocompatíveis, resistentes a impacto, possuem boa resistência mecânica e estabilidade química e física. Testes demonstraram que estas fibras suportam aquecimento acima de 500°C por mais de 10 horas sem nenhum dano ao material, indicando que o material pode ser esterilizado em altas temperaturas (Tong et al., 2002b).

O íon Nd^{3+} é utilizado para dopar a fibra de YAG devido à sua compatibilidade com o material e sua característica espectral. A concentração dos íons na fibra pode variar de 5 átomos% (at%) até 15at%. (Tong et al, 2002a)

A busca pela otimização da utilização de micro e nanopartículas no tratamento fotodinâmico do câncer tem crescido, conforme observado na literatura. Li et al (2009) demonstraram a eficiência da terapia fototérmica em associação com nanopartículas de ouro conjugadas com Polietileno glicol (PEG) e PEG-transferrina no tratamento de células tumorais. Nanopartículas de ouro também foram utilizadas por El-Sayed et al (2006) no tratamento fototérmico de alguns tipos de carcinoma epitelial, obtendo êxito quanto a morte das células. Partículas de outros materiais como óxidos de ferro e lipossomos vem sendo aplicados na terapia hipertérmica do câncer, partículas estas associadas ou não a anticorpos, fragmentos de DNA ou outras moléculas que possam auxiliar no combate a doença.

No presente projeto foi verificada a resposta de células de fibroblastos e Hep2 *in vitro* tratadas com partículas de óxido de ferro e ferro-cálcio, assim como, a caracterização dessas partículas.

CAPITULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O câncer tem múltiplas origens e suas causas incluem estilo de vida, fatores ambientais e suscetibilidade genética hereditária. Acredita-se que até 80-90% de todos os cânceres podem ser causados por fatores ambientais ou por estilo de vida (Spence R.A.J & Johnston, P.G., 2003). Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/Organização Mundial da Saúde (OMS) (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos.

Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorrerão nessas localidades (Estimativa 2010, Instituto Nacional de Câncer).

Segundo a Estimativa 2010 de Incidência de Câncer no Brasil elaborada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), espera-se a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer no Brasil, onde os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino. São esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil).

Na ausência de medidas preventivas práticas para câncer, em alguns casos seu controle pode ser obtido por detecção e tratamento precoces. Na tentativa de detectar o câncer em um estágio inicial, é importante concentrar-se na face oculta quando a lesão é assintomática. A

detecção precoce é fundamental, pois qualquer demora pode ser prejudicial para o paciente. A detecção clínica precoce significa que o câncer pode ser detectado quando está localizado e não apresenta disseminação regional ou distante pra linfonodos ou outras vísceras (Spence R.A.J & Johnston, P.G., 2003).

Apesar de o câncer, geralmente, derivar de um único clone de células transformadas, o processo de progressão tumoral promove considerável diversidade genética entre as células neoplásicas em crescimento (Kumar et al, 2005). Tais células são submetidas a inúmeros mecanismos de pressão seletiva, incluindo a hipóxia por vascularização inadequada e, provavelmente, o ataque pelo sistema imune. A seqüência de eventos, desde a primeira célula alterada até a metástase, envolve uma série de interações entre a célula tumoral e células imunes, estromais, endoteliais e macrófagos que estão envolvidas em processos tão diversos quanto angiogênese, invasão e evasão imune (Torrezini et al, 2008).

A carcinogênese resulta de múltiplas etapas e pode envolver dezenas, até centenas, de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, sendo os principais grupos de genes envolvidos nesse processo: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (Rocha, J.C.C. & Silva, S.N., 2003). A identificação dos genes envolvidos no câncer proporciona uma melhor compreensão acerca da doença, bem como contribui para novas formas de diagnosticá-lo mais precocemente, facilitando assim o seu tratamento (Garnis, C. et al, 2004).

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. A análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. (Grivicich et al, 2007).

As mudanças que levam ao desenvolvimento do câncer são supostamente causadas por alterações em seqüências de DNA (mutações, deleções/inserções ou rearranjos cromossômicos) e produção de proteínas aberrantes funcionais. Além das alterações nas seqüências dos genes, vários eventos epigenéticos podem afetar a expressão gênica e, assim, influenciar quantitativamente o nível de proteínas fisiológicas (Scholzová et al, 2007).

Até agora, em todos estes cenários o mRNA é visto como um produto intermediário “passivo” entre o DNA (com potencial codificador) e as proteínas (com potencial executor).

Porém, evidências recentes sugerem que diferentes tipos de moléculas de RNA exercem importantes papéis na regulação gênica, não apenas no nível do processamento do mRNA e regulação de sua estabilidade, mas também no nível da transcrição gênica (Scholzová et al, 2007). Por exemplo, no citoplasma, o metabolismo dos mRNA é melhor regulado pelo controle da movimentação dos mRNA e pela sua eficiência de translação. A perda de regulação destes processos pode contribuir significativamente para a carcinogênese (Parker et al, 2004; Wilusz et al, 2001; Pandolfi, 2004; Stoneley et al, 2003).

O “splicing” alternativo, que potencialmente gera um largo número de mRNA de um único gene, é um mecanismo que aumenta o número de proteínas e suas isoformas codificadas por um controlado número de genes (Stamm et al, 2005). O câncer está muitas vezes associado com a predominância de uma forma de proteína de Splice que não é visto no tecido normal das redondezas. A existência de uma isoforma de proteína de câncer específica tem sido documentada para os receptores humanos de estrógeno e progesterona, para o gene supressor de tumor BRCA1 que atua na patogênese hereditária do câncer de mama ou do ovário, para antígeno CD44 e para o fator de crescimento vascular endotelial, entre outros (Dowsett et al, 1997; Hisatomi et al, 2003; Liu et al, 2001; Cooper et al, 1995; Woolard et al, 2004). Moléculas de RNA são capazes de influenciar a regulação da expressão genética global e, assim, modificar o destino do desenvolvimento das células cancerosas (Mattick, J.S., 2004).

No início do século XX, em 1909, Paul Ehrlich propôs o papel do sistema imune no controle do crescimento de tumores, porém o estágio de desenvolvimento experimental da Imunologia naquele período não permitiu a comprovação científica da hipótese. Na década de 1950, Macfarlane Burnet e Lewis Thomas formalizaram a hipótese da imunovigilância, sugerindo inclusive que a principal vantagem evolutiva da imunidade celular seria o controle do crescimento neoplásico nos organismos multicelulares (Dunn et al, 2002).

A atuação da imunidade no controle do surgimento de neoplasias incipientes foi amplamente demonstrada no modelo murino, revigorando o conceito de imunovigilância e, inclusive, demonstrando o papel do sistema imune no controle do crescimento de neoplasias em estágios mais avançados. Com isso, em uma ampliação do conceito inicial de imunovigilância, o sistema imune exerce uma pressão seletiva sobre os tumores, induzindo sua eliminação ou seleção de subclones menos imunogênicos, e assim molda seu fenótipo durante a progressão tumoral (Dunn et al, 2004).

Assim, o sistema imune interage com a célula tumoral não só na sua formação, mas também no seu desenvolvimento. Inicialmente, o sistema imune reconhece as células

transformadas e recruta moléculas pró-inflamatórias, caracterizando o processo de eliminação. Em um segundo momento, as células tumorais selecionadas que não foram destruídas geram variantes que carregam mutações possibilitando a resistência. Segue-se uma fase de equilíbrio com o sistema imune, na qual coexistem as células de baixa imunogenicidade que compõem o tumor e as células e moléculas responsáveis pelo controle do crescimento das mesmas. Por fim, após esta seleção natural darwiniana, as células tumorais se desenvolvem agora em um ambiente virtualmente anérgico (fase de evasão) (Torrezini et al, 2008).

Os braços inato e adaptativo da imunidade formam um sistema integrado de defesas do hospedeiro, no qual diversas células e moléculas funcionam cooperativamente. A resposta adaptativa às células tumorais depende da apresentação de epítomos de antígenos das células tumorais no sítio de ligação de moléculas do MHC (complexo maior de histocompatibilidade) classe I (Torrezini et al, 2008). A imunidade inata envolve uma ampla variedade de células, fatores humorais e respostas de tecidos. Quanto à resposta a tumores, a principal via efetora depende das células NK (*natural killers*) (Janeway et al 2001).

Células que sofreram algum tipo de estresse, tais como: calor, raios UV, hipóxia e danos no DNA aumentam a expressão de produtos dos genes MHC Ib em sua superfície que, diferentemente dos MHC I convencionais, estão frequentemente aumentados em tumores infiltrados por linfócitos que expressam proteínas relacionadas com MHC I (Smyth et al, 2005).

Modelos animais são capazes de reproduzir aumento do risco de câncer por condições de estresse crônico. A base biológica para tais efeitos foi recentemente revisada e inclui a liberação de catecolaminas pelo sistema nervoso autônomo durante o estresse crônico, sendo que estas podem agir como pró-angiogênicos e, mais do que isso, receptores beta adrenérgicos em algumas linhagens tumorais podem ativar mecanismos de migração e invasão de células tumorais. Além disso, a depressão crônica está relacionada à interferência na secreção de hormônios hipotalâmicos sobre controle cognitivo (do córtex cerebral) e emocional (do sistema límbico), resultando em ativação do eixo endócrino que tem como resultado final níveis consistentemente elevados de cortisol, um glicocorticóide que deprime a função imunológica e ativa genes de sobrevivência celular (Antoni et al, 2006).

Entre 1990 e 2005 as mortes por câncer declinaram a uma taxa de 1% ao ano nos Estados Unidos. A diminuição na mortalidade tem sido em média 2% ao ano para o câncer de mama, o câncer de próstata, o câncer colorretal e o câncer de pulmão, este último entre os homens (Byers, 2010). O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres nos Estados Unidos (Giovino, 2002). O tratamento para o câncer de mama

avançado continua sendo ineficiente, embora tenha havido alguns avanços recentemente para alguns pacientes para os quais uma maior sobrevida tem sido conseguida com agentes para alvos moleculares. O maior fator que determinará as tendências de mortalidade para o câncer de pulmão na próxima década será o uso do tabaco (Byers, 2010).

O câncer colorretal é a segunda principal causa de morte por câncer nos Estados Unidos (Byers, 2010). Segundo a Fundação Mundial de Pesquisa sobre Câncer (WCRF, 2009) a obesidade e o sedentarismo podem juntos explicar mais de 25% dos casos de câncer colorretal nos Estados Unidos.

O câncer de mama é a principal neoplasia com novos diagnósticos relatados entre mulheres nos Estados Unidos (Byers, 2010). A obesidade pode explicar 20% do risco de adquirir câncer de mama, e continua aumentando, mais de 60% das mulheres americanas estão acima do peso ou obesas (WCRF, 2009; Mokdad et al, 2001). O declínio nas mortes por câncer de mama em mais de 2% ao ano desde 1990 parece ter resultado de uma mistura igual de diagnóstico precoce e melhor tratamento (Berry et al, 2005).

A próstata é o principal local para novos diagnósticos de câncer entre homens nos Estados Unidos (Byers, 2010). A Política para Prevenção de Câncer de Próstata proporcionou um importante prova do princípio de que terapias antiandrogênicas podem reduzir o risco de câncer de próstata (Thompson et al, 2003). Já para o melanoma, a incidência tem aumentado substancialmente recentemente, provavelmente devido aos efeitos combinados da exposição solar prévia e aumento da conscientização e diagnóstico das lesões pigmentadas, mas sua mortalidade tem permanecido essencialmente inalterada (Byers, 2010).

2.2. Melanoma Cutâneo Maligno

O Melanoma cutâneo maligno é uma neoplasia originada dos melanócitos presentes predominantemente na pele ou de células precursoras multipotentes derivadas da crista neural. O melanoma pode se desenvolver diretamente dos melanócitos ou de nevos cutâneos (Kumar et al, 2005; Stecca et al., 2007). A maior parte dos melanomas origina-se na pele, porém outros sítios de origem incluem as mucosas oral e anogenital, derme, esôfago, meninges, olhos, cóclea e aparato vestibular (Kumar et al, 2005; Stecca et al., 2007; Rath, 2006).

A pele é um órgão de revestimento com um objetivo protetor composta por um número de tipos celulares e estruturas que formam a epiderme e a derme. A epiderme é composta por células como: a) queratinócitos, que tem como principal função a produção de queratina; b) melanócitos, responsáveis pela produção de melanina; entre outras. Na derme encontram-se as glândulas sudoríparas, os folículos pilosos, os dendrócitos, as glândulas sebáceas, vasos sanguíneos e outras estruturas celulares (Kumar et al, 2005).

O melanoma cutâneo maligno é o tumor com o maior grau de malignidade dentre as neoplasias da pele (Rath, 2006). É usualmente assintomático, embora possa ocorrer prurido como manifestação precoce. O sinal clínico mais importante é a alteração na cor, tamanho ou formato de uma lesão pigmentada. Este último está relacionado com a notável variação de pigmentação do melanoma, aparecendo em tons de negro, marrom, vermelho, azul-escuro e cinza conforme a figura 1. Em alguns casos zonas de hipopigmentação branca ou cor-da-pele também estão presentes (Kumar et al, 2005).

Figura 1. Melanoma caracterizando as variações na coloração e assimetria. Retirado do World Health Organization Classification of Tumours, 2006.

O melanoma é classificado clinicamente em quatro tipos principais, mas esta classificação tem pouco valor prognóstico e relevância diagnóstica. Os quatro tipos são: Melanoma Maligno Lentigo, que se desenvolve quando um tumor invasivo torna-se um Lentigo Maligno; Melanoma de Expansão Superficial, cresce lateralmente antes do desenvolvimento e invasão verticais, sendo o tipo de melanoma mais comum nos

Caucasianos; Melanoma Nodular, se apresenta como um nódulo pigmentado de rápido crescimento que sangra ou sofre ulceração. Este último é o mais agressivo dos melanomas, presente com frequência em locais que sofrem exposição intermitente a luz Solar e Melanoma Lentiginoso Acral, uma lesão pigmentada que cresce na palma da mão, sola do pé ou sob as unhas (LeBoit et al, 2006).

Os vários graus de desenvolvimento do melanoma, chamados de estadiamento, são classificados baseados na análise patológica da lesão e histológica dos fragmentos retirados para biópsia. Considerando-se a patologia da neoplasia maligna, utiliza-se o critério denominado ABCD, apresentado na tabela 1.

Tabela 1 Critérios patológicos para classificação de melanoma (adaptado de Rath, 2006).

Critérios ABCDE	
A	Assimetria
B	Bordas – irregular
C	Cor – heterogênea, despigmentada
D	Diâmetro – maior do que 5 mm
E	Elevação – plano, nodular, escamoso, erosão, sangramento

Para a classificação segundo parâmetros histológicos, denominada microestadiamento, existem três sistemas utilizados: a) Clark, que avalia o nível de invasão anatômica do tecido; b) Breslow, mede a extensão da invasão tecidual no sentido vertical (espessura tumoral) e c) o manual da American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma (AJCC) (Rath, 2006; Balch et al., 2001). A classificação de Clark e Breslow encontram-se nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Classificação de Clark para melanoma cutâneo baseado em parâmetros histológicos. (adaptado de Rath, 2006).

Nível anatômico de invasão	
Clark nível I	Intraepidermal – Melanoma <i>in situ</i>
Clark nível II	Invasão nas papilas dérmicas
Clark nível III	Invasão das bordas das papilas dérmicas/ derme reticular e preenchimento da derme papilar
Clark nível IV	Invasão da derme papilar
Clark nível V	Invasão do tecido gorduroso subcutâneo

Tabela 3: Classificação de Breslow para melanoma cutâneo baseado em parâmetros histológicos. (adaptado de Rath, 2006).

Microestadiamento de Breslow		
Breslow	Espessura do tumor (mm)	Risco de metástase
1	$\leq 0,75$	Mínimo
2	0,76 - 1,5	Baixo
3	1,51 – 4	Intermediário
4	> 4	Alto

A AJCC utiliza a tríade tumor-nódulo-metástase (TNM) para a classificação histológica do melanoma e o “estado de agrupamento”, conforme as tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4: Classificação TNM para melanoma (adaptado de Balch et al., 2001).

Classificação T	Espessura (mm)	Ulceração
T1	$\leq 1,0$	a: sem ulceração e nível II/III ³ b: com ulceração e nível IV/V ³
T2	1,01 – 2,0	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 – 4,0	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4	a: sem ulceração b: com ulceração
Classificação N	Nº. de nódulos metastáticos	Massa nodal metastática
N1	1	a: micrometastases ¹ b: macrometastases ²
N2	2 – 3	a: micrometastases ¹ b: macrometastases ² c: em trânsito/ nódulos satélites sem metástase
N3	≥ 4 nódulos metastáticos, ou dispersos, ou em trânsito/ nódulo satélite com metástase	
Classificação M	Local	Lactato desidrogenase no soro
M1a	Pele, tecido subcutâneo ou nódulos	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Metástases viscerais Qualquer metástase distante	Normal Elevada

¹ Micrometástases são diagnosticadas após linfadenectomia eletiva ou de gânglio satélite.² Macrometástases são definidas como nódulos metastáticos clinicamente detectáveis confirmados por linfadenectomia terapêutica ou quando a metástase nodular exibe grade extensão extracapsular.³Nível de invasão de Clark.

Tabela 5: Estado de agrupamento para Melanoma Cutâneo (retirado de Balch et al., 2001).

	Estadiamento Clínico ¹			Estadiamento Patológico ²		
	T	N	M	T	N	M
0	Tis ³	N0	M0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	T1b	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III*	Qualquer T	N1 N2 N3	M0			
IIIA				T1-4a	N1a	M0
				T1-4 ^a	N2a	M0
IIIB				T1-4b	N1a	M0
				T1-4b	N2a	M0
				T1-4a	N1b	M0
				T1-4a	N2b	M0
				T1-4a/b	N2c	M0
IIIC				T1-4b	N1b	M0
				T1-4b	N2b	M0
				Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	Qualquer M1	Qualquer T	Qualquer N	M0 M0

¹Estadiamento clínico inclui microestadiamento de melanoma primário e evolução clínica/radiológica para metástases.

²Estadiamento Patológico inclui microestadiamento de melanoma primário e informações patológicas sobre o linfonodo regional após linfadenectomia parcial ou total.

³Melanoma *in situ*.

*Não existe subgrupos de estágio III para estadiamento clínico.

No “estado de agrupamento” os estágios I e II utilizam como critério primário para a classificação T a espessura do tumor e a presença ou não de ulceração. A ulceração é definida como ausência de epiderme intacta sobre a porção maior do melanoma primário (Balch et al., 2001). O estágio III inclui as metástases regionais, tanto nos linfonodos regionais como em metástases intralinfáticas em linfonodo satélite. O estágio IV inclui as metástases distantes em quaisquer tecidos ou órgãos do corpo (Balch et al., 2001).

O melanoma cutâneo é um significativo problema de saúde mundial, sua incidência tem aumentado 3-7%, em média, nas últimas décadas (Sabatino et al., 2009). A etiologia do melanoma está relacionada com exposição solar esporádica ou intermitente, tipo de pele, nevos benignos múltiplos, nevos atípicos múltiplos, histórico de queimaduras por exposição solar na infância e o histórico familiar para a doença, sendo este considerado um dos fatores de risco mais significantes (Berwick et al., 2005; Hayward, 2003; Rath, 2006).

A radiação ultravioleta (UVR) é parte do espectro da radiação eletromagnética emitida pelo Sol. Esta radiação é dividida em três comprimentos de onda distintos, sendo eles UVA (400-320 nm), UVB (320-290 nm) e UVC (290-200 nm) (Lucas, R. et al, 2006). A radiação solar que alcança a superfície terrestre é composta, em parte, por dois tipos de radiação eletromagnética ultravioleta UVB e UVA e luz visível (De Fabo et al., 2004). Os raios UVA não são melanogênico, implicando que na luz solar natural os raios UVB são carcinogênicos para o melanoma. A radiação UV é absorvida no DNA o que leva à formação de fotoprodutos de dipirimidina UV específicos (Martínez et al., 2005). Deste modo, a exposição ao Sol e a radiação UV são os maiores fatores de risco ambiental para o desenvolvimento de melanoma (Tucker et al., 2003).

A exposição à radiação UV resulta em melanogenese aumentada através de mecanismos envolvendo efeitos diretos sobre os melanócitos, aumentando a produção local do Hormônio estimulante de melanócitos alfa (MSH), e um efeito parácrino do óxido nítrico produzido pelos queratinócitos (Luger et al., 1997; Romero-Graillet et al., 1997). O MSH estimula a produção de melanina que é composta por uma mistura de dois pigmentos quimicamente distintos: a eumelanina e a feomelanina. A eumelanina tem efeito fotoprotetor minimizando os danos causados pela irradiação solar, enquanto a feomelanina é fracamente fotoprotetora (Gibbs et al., 2002).

O fator hereditário está ligado a mutações ou alterações em genes que controlam o ciclo celular ou a manutenção do ambiente celular. Alguns genes são considerados susceptíveis para o desenvolvimento de melanoma, como o *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inibitor 2A) responsável pela síntese da proteína p16 que tem papel crítico no

controle do ciclo celular, GSTM1 (glutathione S-transferase gene), entre outros (Gibbs et al., 2002).

O surgimento do melanoma resulta da transformação dos melanócitos presentes na epiderme (Rath, 2006). O crescimento dos melanócitos é controlado pelos queratinócitos que rodeiam estas células através ação parácrina de fatores de crescimento extracelular, da comunicação intracelular por meio de segundo mensageiro e transdução de sinais e comunicação intercelular via moléculas de adesão célula-célula, célula-matrix e junções comunicantes “gaps junctions” (Haas et al., 2004). Sobre condições normais a homeostase celular determina o comportamento celular. A perda da homeostase celular pode desencadear proliferação celular continua dos melanócitos que pode levar ao surgimento do melanoma. As características de tumores sólidos são proliferação descontrolada, perda da diferenciação morfológica e celular, invasão e metástase (Haas et al., 2005).

É provável que a perda da homeostase celular e conseqüente falta de resposta ao controle dos queratinócitos por parte dos melanócitos se deva à diminuição da expressão de receptores celulares importantes na comunicação e adesão aos queratinócitos, super expressão de receptores e moléculas sinalizadoras importantes para interação melanoma-melanoma e melanoma-fibroblastos e perda de ancoragem a membrana basal devida à expressão alterada de moléculas de adesão da família das integrinas (Haas et al., 2005).

O histórico familiar, quantidade de nevus e cor da pele estão relacionados com o desenvolvimento de melanoma cutâneo. Um maior número de nevus confere maior risco de desenvolvimento do câncer, assim como é reconhecido que indivíduos de pele clara são mais susceptíveis ao desenvolvimento de melanoma do que os indivíduos de pele mais escura (Tucker C, 2003).

Atualmente existem hipóteses que sugerem que tumores são iniciados e mantidos por meio de linhagens celulares capazes de auto-renovação e diferenciação dentro da massa tumoral, as células tronco cancerígenas (CTC) (Odoux et al, 2008; Reya et al, 2001). O termo células tronco cancerígenas é uma definição funcional que tem sido proposta para a identificação de um subgrupo de células cancerígenas capazes de iniciar tumores e se diferenciar em proles heterogêneas similares ao tecido original dos quais elas foram obtidas (Sabatino et al, 2009). Grichnik et al (2006a) demonstraram a existência de células tronco mutantes em melanomas metastáticos. Fang et al (2005) descreveram um subtipo celular derivado de linhagem celular de melanoma que eram capazes de formar “melanomas esféricos”. Estas células exibiram capacidade de auto-renovação *in vitro* e *in vivo*.

As precursoras das CTC são provavelmente responsáveis pelo processo de metástase enquanto as progenitoras menos estáveis são incapazes de invasão tecidual local ou distante (Grichnik J.M., 2006b; Reya et al, 2001). Muito ainda precisa ser aprendido sobre a verdadeira biologia das CTC, sua evolução genética e fenotípica em resposta aos estímulos ambientais, a hierarquia de diferenciação e sua estratégia de sobrevivência (Sabatino et al, 2009).

2.3. Vidros de fosfato

Os vidros fosfatos pertencem à família dos vidros óxidos e têm como formador o P_2O_5 , sendo conhecidos há mais de 100 anos. A unidade formadora básica dos vidros fosfatos, a exemplo do que se observa para os fosfatos cristalinos, são tetraedros PO_4 que apresentam três ligações simples e uma dupla. Como um dos quatro oxigênios participa de uma ligação dupla com o fósforo, cada tetraedro PO_4 está conectado a apenas outros três tetraedros, originando as cadeias tridimensionais que compõe a estrutura dos vidros fosfatos. Outra consequência da conexão de cada tetraedro por apenas três vértices é uma rigidez inferior àquela verificada para os vidros silicatos. Nestes últimos, todos os oxigênios de cada tetraedro SiO_4 se ligam a outro átomo de silício, dando lugar a redes com mais pontos de conexão, o que se traduz em vidros mais rígidos (Varshneya, A.K., 1994).

Na Figura 2 são apresentados os tipos mais comuns de grupamentos fosfato, onde a característica básica que distingue os ortofosfatos (Figura 2a) dos pirofosfatos (Figura 2b) e metafosfatos (Figura 2c) é a presença de oxigênios ligados em ponte (*bridging oxygens*). A adição de cátions modificadores, tais como, Li^+ , Na^+ e Ca^{2+} , provoca a despolimerização (rompimento) da rede tridimensional do fosfato (Figura 3a), por meio da quebra das ligações P-O-P, favorecendo com isto, o aparecimento dos oxigênios *non-bridging* (Figura 3b-c) (Martin, S.W., 1991).

Figura 2. Tipos mais comuns de grupamentos fosfato: (a) ortofosfato; (b) pirofosfato; (c) metafosfato linear. (retirado de Martin, S.W., 1991).

Os tetraedros PO_4 são classificados de acordo com a quantidade de oxigênios em ponte ao redor do núcleo de fósforo central. Esta classificação foi desenvolvida por Van Wazer (1958), fazendo uso da notação Q^n , onde n corresponde ao número de oxigênios ligados covalentemente a outro tetraedro, conforme mostrado na Figura 4.

Figura 3. Esquema da estrutura tridimensional do: (a) P_2O_5 puro; (b) com a introdução de cátions modificadores e (c) estrutura tipo polimérica. (retirado de Martin, S.W., 1991).

Figura 4. Diferentes arranjos dos tetraedros PO_4 – Teoria dos Sítios Q_n . (retirado de Peng et al, 1991).

Vidros a base de fosfato tiveram sua utilização restrita durante muito tempo, devido à sua baixa durabilidade química. Por esse motivo, até a década de 80, eles não apresentavam grande interesse tecnológico e eram utilizados apenas em ambientes com umidade relativa

reduzida. Um bom exemplo disso são os vidros binários do tipo $M_2O-P_2O_5$ que, obtidos com facilidade, apresentam alto grau de higroscopicidade. A melhoria dos vidros à base de fosfato quanto a este aspecto só foi obtida com a introdução de modificadores apropriados e também com o uso de sistemas ternários, quaternários ou multicomponentes. Vidros à base de fosfato obtidos a partir desses sistemas apresentavam durabilidade química consideravelmente superior, o que retomou assim o interesse por este sistema (Peng et al, 1991).

Essa retomada de interesse coincide com as primeiras tentativas de imobilização de resíduos sólidos perigosos em sistemas desse tipo. O grande salto de qualidade se deu com os vidros de fosfato de ferro e chumbo, surgidos em 1984, muito menos corrosivos, processados a baixas temperaturas, com baixos tempos de fusão e de elevada durabilidade química (Day et al, 2000). Atribuiu-se este fenômeno principalmente à presença de íons ferro na composição desse vidro (Reis et al, 2002a; Sales et al, 1984; Reis et al, 2002b).

Quantidades consideráveis de fósforo são perdidas durante a fusão de vidros do sistema $x Fe_2O_3 - (100-x) P_2O_5$ quando a concentração de ferro é menor que 20%. Contudo a concentrações de ferro maiores ($30 < x < 50$), as perdas de fósforo são mínimas e de difícil detecção via análise química. A grande maioria dos sistemas estudados emprega o Fe_2O_3 e o P_2O_5 como fontes de ferro e fósforo. Contudo outras matérias primas à base destes óxidos podem ser utilizadas sem ressalvas. O ácido fosfórico e o fosfato de amônia podem ser empregados como fonte de fósforo sem a desvantagem de apresentar a alta higroscopia do P_2O_5 . A magnetita (Fe_3O_4), por exemplo, pode ser utilizada livremente sem causar danos às propriedades físicas e químicas destes vidros (Day et al, 2000).

Estudos de Day et al mostram que, independentemente da fonte de ferro (FeO , Fe_2O_3 ou Fe_3O_4), a composição final desses vidros é formada por uma fração de FeII residual ($FeII/(FeII + FeIII)$), entre 20-30% nas condições ideais de fusão. Diferentes atmosferas (ar, nitrogênio e oxigênio) tem um efeito mínimo na concentração de FeII (20 a 22% de FeII), havendo somente mudanças abruptas na concentração desse elemento com aumentos excessivos na temperatura e no tempo de fusão. Longos tempos e temperaturas de fusão aumentam a concentração de FeII, atingindo facilmente teores acima dos 45%. Entretanto vidros com teores de FeII acima de 45% apresentam problemas de cristalização durante o resfriamento, com reflexos negativos na durabilidade química dos mesmos (Day et al, 2000; Ray et al, 1999; Fang et al, 2001; Karabulut et al, 2002b). A adição de outros elementos que não os óxidos principais (Fe_2O_3 e P_2O_5) influenciam também na concentração final de FeII.

A durabilidade química dos vidros de fosfato de ferro é em geral medida pela taxa de dissolução ($g/(cm^2.min)$) destes em água destilada a 90 °C por um período de até 32 dias.

Pesquisas de Day et al, mostram que a solubilidade destes vidros nestas condições pode ser cerca de mil vezes menor que a dos borossilicatos. No caso dos vidros de fosfato de ferro, o aumento da durabilidade química é ainda maior. A excepcional durabilidade química desses vidros se deve à formação de ligações tipo Fe-O-P que substituem as ligações facilmente hidratadas P-O-P presentes nos vidros de fosfato anteriores, portanto o ferro atuando como formador de rede. Aumentos na concentração de ferro aumentam a concentração das ligações Fe-O-P, aumentando desta forma a durabilidade química destes vidros (Day et al, 2000).

Kim & Day (2004) afirmam que vidros de fosfato de ferro podem ser fundidos a baixas temperaturas ($< 1200^{\circ}\text{C}$), chegando em alguns casos a temperaturas da ordem de 950°C , dependendo da composição. Apresentam ainda baixo tempo de fusão, uma vez que possuem baixa viscosidade (200 a 900 centipoise) do fundido, podendo ser facilmente homogeneizados. O mesmo não ocorre no processamento de vidros tipo AR resistentes a álcalis, à base de silicatos. Menores temperaturas e tempos de fusão levam a um processamento mais seguro e de menor custo, sendo necessários fornos de menor dimensão para uma mesma produção diária de vidro.

Vidros à base de fosfato tem sido utilizados na área médica como biomateriais. Podem ser potencialmente utilizados como “scaffolds”, possuindo excelentes propriedades físicas e químicas permitindo ser modelados de acordo com o local a ser aplicados (Knowles et al, 2001). Bitar et al (2004) demonstraram que vidros de fosfato são biocompatíveis, suportando ligação, crescimento e manutenção da diferenciação celular de osteoblastos e fibroblastos. O mesmo autor utilizou vidros de fosfato com altas concentrações de CaO (48%mol) e demonstrou que nenhum efeito adverso na expressão genética foi verificada nos osteoblastos e fibroblastos.

Ahmed et al (2004), estudaram a dissolução e propriedades térmicas de várias composições de vidros de fosfato de ferro quaternários ($\text{CaO-Na}_2\text{O-Fe}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$), observando aumento da temperatura de transição vítrea (T_g) com o aumento da concentração de CaO e Fe_2O_3 (mol%), assim como, diminuição da dissolução dos mesmos. O mesmo autor verificou a biocompatibilidade destes vidros em células precursoras musculares.

2.4. Tratamento do Melanoma

O tratamento do melanoma atualmente consiste na retirada cirúrgica da lesão e utilização de agentes quimioterápicos como ferramenta paliativa, assim como a radioterapia, visto que estes agentes não apresentam resultados significativos no combate ao tumor e nas células metastáticas. Várias estratégias vêm sendo tentadas no combate ao melanoma, como imunoterapia (Saenger et al, 2008), novos agentes quimioterápicos (Queirolo et al, 2006) e tratamento hipertérmico (Ito et al, 2003; Kostenich et al, 2000).

O primeiro agente quimioterápico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de melanoma em estágio avançado foi a dacarbazina, um agente alquilante que não apresenta uma resposta significativa. Outros agentes foram tentados, como as nitroureias, carmustina e lomustina; os alcalóides da vinca, vincristina e vinblastina; os compostos da platina, cisplatina e carboplatina; e os taxanos, taxol e docetaxol, porém nenhum destes agentes apresentou uma melhoria em relação à dacarbazina (Grossman, D. et al, 2001).

Alguns agentes quimioterápicos tem como ação a inibição de proteínas quinases que atuam na cadeia intracelular ativando a proliferação celular, a angiogênese, a progressão das células tumorais, entre outros. Dentre esses agentes, encontra-se o Sorafenibe, que está relacionado com o retardo do crescimento de melanoma em estudos pré-clínicos (Karasarides et al, 2004) e o Mesylato de Imatinibe, que se mostrou capaz de suprimir o crescimento celular do melanoma (Redondo et al, 2004). Outras vias alvo e seus respectivos agente são: apoptose (Oblimersen), angiogênese (Bevacizumab), ubiquitinação (Bortezomib) e degradação da matriz extra celular (Queirolo et al, 2006).

O tamoxifeno é um antagonista do receptor de estrogênio utilizado rotineiramente no tratamento do câncer de mama. Estudos *in vitro* sugerem a presença do receptor de estrógeno em células de melanoma. O tamoxifeno tem sido utilizado desde os anos de 1970 no tratamento de melanoma como único agente ou em combinação com outros agentes quimioterápicos (Rusthoven, J.J., 1998).

A resposta imune do indivíduo tem sido considerada como importante papel na história natural do melanoma. Isto tem resultado em considerável interesse nos modificadores da resposta celular, em particular o interferon alfa (INF- α) e a interleucina-2 (IL-2) e a combinação deste com a quimioterapia convencional, tratamento este chamado de bioquimioterapia. O INF- α apresenta várias propriedades, como a ação direta nas células

tumorais agindo como citostático, promovendo a diferenciação celular e aumentando o MHC e a expressão de antígenos associados com tumor. Ainda, atua como agente imunomodulatório aumentando a função das células NK, dos macrófagos e dos linfócitos T, além de apresentar propriedades anti-angiogênicas (Chowdhury et al, 1999).

A IL-2 é uma citocina que não apresenta atividade anti-tumoral intrínseca, porém ela atua por meio de mecanismos que incluem a ativação de linfócitos T citotóxicos e células NK, além de ativarem a produção de outras citocinas. O INF- α e a IL-2 tem sido combinados por causa de seus diferentes mecanismos de ação e evidências experimentais que sugerem sinergismo entre eles (Chowdhury et al, 1999). Lesinski et al (2008) utilizaram Berteomib em associação com IFN- α e demonstraram a indução sinérgica da apoptose de linhagens celulares humanas de melanoma. A apoptose pela estimulação da via intrínseca mitocondrial e pela via extrínseca, por meio da ativação da caspase-8, leva à supressão de genes e proteínas envolvidas na apoptose.

A relação da resposta imune do indivíduo perante a presença das células tumorais levou à tentativa de desenvolvimento de terapias utilizando-se vacinas anti-tumorais. O primeiro epítipo tumoral de células T e antígenos para câncer foram identificados para o melanoma. A partir daí, vários epítipos derivados de aproximadamente 100 antígenos tumorais foram identificados, a maioria para o melanoma (Novellino et al, 2005).

Haug et al (1998) e Tafra et al (1995) relataram a presença de resposta imune celular e humoral a antígenos de melanoma em pacientes com melanoma avançado tratados com ressecção cirúrgica e utilização de imunoterapia adjuvante pós-operatória. Tamura et al (1997) demonstraram que a vacinação de animais com HSP (heat shock proteins) derivadas de células tumorais podem produzir imunidade tumor específica.

O tratamento hipertérmico é outra via utilizada no tratamento de cânceres, essa técnica é utilizada desde praticamente o início da medicina. Hipócrates, considerado o pai da medicina, havia proposto que a superfície de tumores poderia ser cauterizada pela aplicação de ferro aquecido. Atualmente, métodos mais modernos são empregados para a geração de calor e tentativa de destruição do tumor (Nielsen et al, 2001). A utilização de partículas magnéticas como mecanismo para a geração de calor nas células tumorais vem sendo largamente aplicada na medicina. Vários são os aparelhos empregados para esse fim.

A hipertermia por indução magnética possibilita a exposição dos tecidos tumorais a um campo magnético alternado. Quando as partículas magnéticas são sujeitadas a um campo magnético variável, um pouco de calor é gerado devido à diminuição da histerese magnética. A quantidade de calor gerado depende da natureza do material e dos parâmetros do campo

magnético (Gupta et al, 2005). Ito et al (2003) demonstraram que a utilização de lipossomos catiônicos magnéticos para gerar hipertermia intracelular é capaz de aquecer especificamente os tecidos tumorais e que o controle acurado da temperatura é possível pela manipulação da intensidade do campo magnético.

Outra forma aplicada para se gerar aquecimento local do tumor é a termoterapia induzida por laser, a qual envolve o aquecimento como resultado da interação laser tecido (Waldow et al, 1992). Um laser de diodo de 810nm e onda contínua tem demonstrado induzir hipertermia de 50-60°C em melanoma coroidal em animais e humanos, seguido por um efeito coagulativo pronunciado (Journee-de korver et al, 1992; Journee-de korver et al, 1995; Journee-de korver et al, 1997). No entanto, esta modalidade de tratamento tem seletividade reduzida devido à dissipação do calor durante a aplicação de fotoirradiação. Por outro lado, lasers pulsados, em comprimentos de onda, intensidade e duração de pulso apropriados, causam aquecimento seletivo e destruição de micro-alvos absorventes da radiação como micro-vasos e melanossomos (Parrish et al, 1991). A terapia com radiação de laser pulsado foi aplicada no tratamento de diferentes tipos de tumores de pele, dentre eles o melanoma (Wagner et al, 1996). Kostenich et al (2000) demonstraram que a utilização de laser pulsado para o tratamento de melanoma é eficaz, levando a danos em estruturas intracelulares e ultra-estruturais, como a membrana basal e fibras colágenas.

Numerosas aplicações biomédicas e de bioengenharia para nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro tem sido amplamente utilizadas para uma variedade de aplicações *in vivo*, entre elas a hipertermia (Gupta et al, 2005). Apesar dos resultados promissores, a hipertermia ainda não tem sido estabelecida em rotinas clínicas. Isto provavelmente se deve não devido à falta de eficácia, mas por causa da limitação das técnicas atuais em relação à seletividade da região tumoral alvo e da distribuição homogênea do calor dentro do tecido tumoral (Thiesen et al, 2008).

2.5. Tratamento Hipertérmico

A temperatura corpórea considerada normal é de aproximadamente 37°C em vertebrados, com poucas variações. Esta temperatura é usualmente elevada para 39-40°C em uma resposta febril a infecções ou outro tipo de estresse (Kluger et al, 1978). A partir de observações clínicas percebeu-se a relação da febre com a regressão espontânea de tumores

(Hobbon, U., 2005; Hoption, D.F., 2003). Por esta razão, a febre tem sido utilizada como ferramenta no tratamento de doenças por meio do aumento intencional da temperatura corpórea dos pacientes (Zhang et al, 2008).

Hipertermia é uma técnica promissora para a terapia contra o câncer e tem sido utilizada por muitos anos para tratar uma variedade de tumores em experimentos animais e clínicos (Van der Zee, J., 2002). A elevação da temperatura corpórea e, conseqüentemente, das células pode levar à liberação de uma família de proteínas relacionada com o estresse celular causado pelo calor. Estas proteínas são denominadas de proteínas de choque térmico (HSP). As HSP foram primeiramente descritas em 1962 como sendo uma classe de proteínas altamente conservadas cuja expressão é induzida e elevada pelo estresse térmico (Ritossa, P., 1962).

As HSP estão localizadas em vários compartimentos sub-celulares incluindo o citoplasma, o núcleo, o nucléolo, o retículo endoplasmático (Heike et al, 1999; Zhang et al, 2006), o aparato de Golgi e a mitocôndria (Sghaier et al, 2004). Muitas HSP são expressas em condições fisiológicas e exercem funções celulares como proteínas chaperonas, na formação de complexos celulares e na degradação de proteínas (Heike et al, 1999).

Existem vários métodos utilizados que possibilitam a liberação local de calor nas lesões cancerosas, incluindo terapia térmica laser induzida (Mensel et al, 2006), abrasão por radiofrequências (Goldberg, S.N., 2001; Haemmerich et al, 2005), abrasão por microondas (Simon et al, 2005), crioabrasão (Skanes et al, 2004) e abrasão extracorpórea com ultra-som de alta intensidade (Haar et al, 2007a; Haar et al, 2007b).

Embora o objetivo principal do tratamento hipertérmico seja destruir as células tumorais diretamente, uma gama de efeitos benéficos secundários são observados durante o período pós tratamento (Zhang et al, 2008). Reinhold et al (1986) relataram que a isquemia causada pela diminuição da perfusão sanguínea é um efeito indireto, o qual pode ser uma das mais importantes causas da morte da célula tumoral.

Com o aumento da temperatura, as células tumorais incham e se partem permitindo a liberação de antígenos. Este fato possibilita uma grande carga de antígenos para a geração de imunidade antitumoral (Jager et al, 2003). Imunidade essa efetuada predominantemente pelas células Natural Killers (NK). Kraybill et al (2002), relataram que o número de células NK no sangue periférico de paciente com câncer aumentou imediatamente após a exposição do indivíduo a tratamento hipertérmico utilizando-se temperatura entre 39.5°-40°C. Temperaturas entre 41-43°C são consideradas de choque térmico para as células, acima de 43°C considera-se como citotóxica.

Molls M. (1992) considera que o limite de temperatura entre 42-45°C trata-se de uma hipertermia moderada. Quando a temperatura celular sofre um aumento de 43°C para 100°C as células tumorais sofrem necrose coagulativa de células e tecidos e danos na microcirculação. Estes efeitos figuram como o provável modo principal de ação para esta terapia (Godlewski et al, 1982; Hanson, D.F., 1993; Haemmerich et al, 2005; Sweetland et al, 1993; Wills et al, 1976). A tabela 6 mostra algumas das propriedades de imunomodulação da hipertermia.

Tabela 6: Propriedades de imunomodulação da hipertermia. Adaptado de Zhang et al, 2008.

Limites de Temperaturas (°C)	
<i>Limite febril (39-40°C) e choque térmico (41-43°C)</i>	Efeitos imunomodulatórios
39, 40, 41	Aumento do reconhecimento de antígenos e fagocitose pelas células dendríticas e macrófagos
39.5, 41, 39, 40	Induz ativação e maturação das células dendríticas
40	Aumento da migração de células dendríticas para os linfonodos
39.5 ± 0.5	Promove o trânsito dos linfócitos para o tecido linfóide e tumoral
39.5, 42,	Aumento da função das células T efectoras: linfócitos T citotóxicos e células natural Killer
43	Aumento da expressão de MHC classe I na superfície tumoral
42, 43	Aumento da expressão de antígenos tumorais; Induz a expressão de HSP que promovem “sinal de alerta” para ativação das células dendríticas; Aumento da suscetibilidade das células tumorais à lise mediada por linfócitos T citotóxicos
Temperatura citotóxica (> 43°C)	Criação de uma fonte de antígenos para indução de uma resposta imune antitumoral

Liu et al (1997) demonstraram que os vasos sanguíneos de tumores tratados com hipertermia exibiram considerável edema e intumescimento das células endoteliais, assim como, agregação plaquetária e aglutinação das células sanguíneas no lúmen vascular tem sido consideradas como um evento inicial na hipertermia a laser do câncer, seguido pela cessação do fluxo sanguíneo nos capilares e necrose do tecido tumoral.

A hipertermia pode ser aplicada no corpo como um todo ou em uma região do corpo para induzir aumento de temperatura até os limites de choque térmico ou citotóxico. Apesar de essas temperaturas não serem suficientes para matar as células diretamente, elas podem modular a atividade imunológica, o fluxo sanguíneo e a permeabilidade tecidual auxiliando outros tipos de tratamentos para o câncer, tais como imunoterapia, radioterapia e quimioterapia (Zhang et al, 2008).

CAPITULO III

3. OBJETIVOS

Verificar a resposta de células de fibroblastos e Hep2 *in vitro* tratadas com partículas de Óxido de Ferro e Ferro-Cálcio, assim como, a caracterização dessas partículas.

CAPÍTULO IV

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Vidros e Micropartículas

Foram produzidos vidros com duas composições: vidros de fosfato de ferro (FeP) e de fosfato de ferro-cálcio (FePCa), sob a supervisão do Prof. Dr. Oscar Peitl Filho, do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), os vidros foram produzidos utilizando sais de fosfato de amônio, carbonato de cálcio e óxido de ferro. Os sais foram pesados e adicionados em recipiente de plástico para posterior homogeneização em homogeneizador orbital. Para facilitar a homogeneização, foram acrescentadas algumas esferas de aço nos recipientes.

Em seguida, o conteúdo dos recipientes foi transferido cadinho e levado ao forno, a uma temperatura de 1050°C com 2 horas de patamar.

Após a fusão, os vidros foram moídos a seco em moinho de alta energia PULVERISETTE 5, com utilização de cadinhos de aço e esferas de aço de diâmetro variando de 10 a 30 mm. Neste processo, foram adicionadas 160 g de cada tipo de vidro produzido em cadinhos, sendo um cadinho para cada vidro, e estes foram moídos durante 75 minutos, em intervalos de 25 minutos para a troca das esferas de aço.

Os vidros não foram recozidos devido ao fato da não necessidade de aumentar a resistência dos mesmos, pois passaram por processo de moagem após a produção. A figura 5 ilustra o moinho de alta energia e o forno para a fusão dos vidros.

Figura 5. A) Moinho de alta energia; B) Forno utilizado na fusão dos vidros.

4.2. Caracterização das partículas

4.2.1. *Análise Granulométrica*

Foi realizada em aparelho BROOKHAVEN Instruments utilizando FOQELS (Fiber Optical Quasi Elastic Light Scattering) com limite de detecção de 2000 nm, para obtenção do diâmetro médio das partículas. As medidas foram realizadas sobre a supervisão da Doutoranda Bianca Machado Cerrutti do laboratório de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos – USP.

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras dos vidros de fosfatos foram colocadas nos suportes e recobertas com uma fina camada de ouro com 20 nm de espessura, em metalizador Balsers modelo SDC 050. As fotomicrografias foram obtidas em equipamento LEO-440 (LEO Electron Microscopy Ltda), sendo utilizado um feixe de elétrons de 20 keV, com detector Oxford (Oxford Instruments Inc.).

4.2.3. Propriedades Ópticas

4.2.3.1. Absorbância

As propriedades ópticas das micropartículas foram determinadas com o auxílio de um espectrômetro USB 2000, Ocean Optics, com lâmpada incandescente dicrótica, com o objetivo de se determinar o espectro de absorção dos materiais. O experimento foi realizado sob a supervisão do Professor Dr. Tomaz Catunda do Grupo de Espectroscopia de Sólidos do Instituto de Física de São Carlos – USP.

Foram utilizados fragmentos polidos de $0,6 \text{ cm}^2$ para as medições.

4.2.4. Capacidade de Aquecimento

Foram diluídas 100 mg, 500 mg e 1 g de partículas de vidro de fosfato de ferro e fosfato de ferro-cálcio em 2 mL de água destilada em poço de placa de cultura de 12 poços.

Para o branco foi utilizado 2 mL de água destilada. Foi utilizado laser de diodo emitindo em 660 nm da QUANTUM TEC até 2 W, com 1,4 W na saída da fibra.

Posicionou-se a fibra óptica a 4,2 cm da superfície do poço, a altura da fibra foi regulada para irradiar 300 mW/cm^2 . Foi utilizado termômetro digital Minipa para medir a temperatura da solução. O experimento foi realizado com o intuito de verificar a capacidade ou não de aquecimento do meio pelas partículas produzidas.

O experimento foi realizado sob a supervisão do Pós-doutorando Emery Cleiton Lins do Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos - USP.

4.2.5. Difração de Raio-X

Foi realizada em aparelho RIGAKU ROTAFLEX RU 200B utilizando-se Goniômetro Horizontal e o método de pó. Foram aplicadas tensão de 50 KV e corrente de 100 mA. O teste foi realizado sob a supervisão do Técnico José Augusto Lopes da Rocha e do Especialista José Geraldo Catarino do Grupo de Cristalografia, Laboratório de Raio-X do Instituto de Física de São Carlos – USP, com objetivo de se determinar a estrutura dos vidros produzidos.

4.3. Citotoxicidade

4.3.1. Cultura celular

Foram utilizadas linhagens celulares de fibroblastos de camundongo McCoy, ATCC número CRL-1696 e células tumorais de laringe humana Hep2, ATCC número CCL-23. Ambas foram cultivadas em meio de cultura ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino e antibióticos penicilina e estreptomicina, em garrafas de polipropileno de 25 cm^2 , crescendo em monocamadas em estufa a 37°C , 95% de ar e 5% de CO_2 (figura 6A).

As células foram cedidas pela Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi do Grupo de Fotossensibilizadores do Departamento de Química e Física Molecular (DQFM) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) Campus São Carlos e os testes realizados sob supervisão da técnica Claudia Cabral.

Figura 6.A) Estufa de CO₂; B) Fluxo laminar utilizado para a manipulação das células.

4.3.2. Obtenção dos extratos

As partículas foram primeiramente esterilizadas em calor seco a 180 °C por 2 horas. Os extratos foram obtidos por meio de processo de extração onde as partículas dos vidros foram deixadas em solução por 24h em meio de cultura celular ISCOVE'S (Sigma). Em seguida, a solução foi filtrada e alíquotas foram retiradas para se obter as concentrações de 10, 25, 50, 60, 75, 90 e 100% dos extratos.

4.3.3. *Difusão de extratos em solução*

As partículas foram submetidas a procedimento de extração por 24h em meio de cultura celular Iscove's (Sigma). Em seguida, 1.10^5 células mL^{-1} de fibroblastos e Hep2 foram semeadas, individualmente, em placa de 96 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 . Após 24h, o meio foi removido e a monocamada de células foi lavada com PBS, pH 7,4. Foram preparadas soluções de extratos nas concentrações: 10, 25, 50, 60, 75, 90 e 100%. Ambas as células foram incubadas com os extratos por 24h, em triplicata. Após 48 h, as células foram tratadas com solução 1 mg mL^{-1} do sal 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT) que reage com as desidrogenases mitocondriais presentes apenas nas células vivas, sendo reduzido ao formazan, um produto que apresenta intensa cor violeta e absorve em comprimento de onda de 570 nm. Após o MTT ser adicionado incubou-se por 3 h em estufa. Ao final deste tempo de incubação o MTT foi retirado e 50 μL de álcool etílico foi adicionado para dissolver os cristais formados. Após dissolução completa, foi adicionado 150 μL de PBS com isopropanol na proporção 1:1. A absorbância foi lida em leitor de microplaca BIO-RAD em 550 nm, sendo proporcional ao número de células vivas. A partir da contagem, pode-se determinar o índice de sobrevivência celular. Para obter o valor de IC_{50} , sendo esse a concentração da droga capaz de matar 50 % da população de células, utilizou-se o programa CalcuSyn.

Como controle negativo foram utilizados fragmentos de papel de filtro e para controle positivo fragmentos de látex, sendo que ambos foram submetidos ao mesmo procedimento de extração supracitado.

4.3.4. *Método de difusão em Agar*

Células de fibroblastos e Hep2 na concentração de 3×10^5 células mL^{-1} foram semeadas, individualmente, em placa de Petri (15x60 mm) com 5 mL de meio e incubadas por 48 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após isto o meio foi descartado e foi adicionado 5 mL de meio "overlay", composto de partes iguais de mínimo de Eagle (MEM) (Cruz et al, 1998).

Fragmentos de cerca de $0,6\text{cm}^2$ dos vidros foram colocados sobre o Agar antes de sua completa solidificação e as placas foram incubadas novamente por 24h.

Como controle positivo foram utilizados fragmentos de látex e como negativo fragmentos de papel de filtro atóxico, ambos estéreis. O experimento foi realizado em triplicata. O teste foi realizado com o objetivo de se determinar a viabilidade celular.

4.3.5. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com peso entre 22-25g no experimento, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O procedimento foi submetido ao Comitê de Ética da UEL, obtendo aprovação sob protocolo número 08/07, processo nº. 38780/06

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas no biotério do Departamento de Ciências Patológicas no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UEL por no máximo 10 dias. Foram mantidos em temperatura ambiente, com ciclo claro-escuro de 12h/12h, com suprimento de água e ração *ad libitum*.

4.3.6. Histopatologia

Foram utilizados 36 camundongos Swiss (25-30g) divididos em 8 grupos tratados com 4 animais cada para duas concentrações diferentes de partículas e um grupo controle. O grupo controle injeção de solução salina, os demais grupos receberam injeção subcutânea de fosfato de ferro e fosfato de ferro-cálcio. Nas doses de 500mg/mL e 1000mg/mL das partículas em um volume final de 500 μL . Os tecidos subcutâneos foram retirados após 2 horas, 24 horas, 72 horas e 1 semana da injeção das partículas e foram retirados e imediatamente fixados em formalina tamponada a 10% por um período máximo de 48 horas. O tecido foi

exaustivamente lavado, desidratado em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e Absoluto), xilol-álcool e xilol e embebido em parafina (4 banhos de 30 minutos cada e posterior inclusão). Cortes de 5 µm foram feitos utilizando o micrótomo Reichert-Jung, corados com hematoxilina-eosina e observados em microscópio óptico.

O infiltrado inflamatório foi classificado de acordo com um grau de 0 a 3, sendo o valor 0 adotado quando não observou-se infiltrado inflamatório e as estruturas teciduais apresentaram-se íntegras e o grau 3 quando há destruição das estruturas teciduais e grande quantidade de infiltrado inflamatório polimórfico.

CAPITULO V

5. RESULTADOS

5.1. Vidros e partículas

5.1.1. Caracterização das partículas

5.1.1.1. Análise Granulométrica

A distribuição granulométrica das partículas de fosfato de ferro produzidas pela técnica de moagem dos vidros mostrou que estas partículas apresentaram diâmetro médio de 830,2 nm conforme a figura 7. As partículas de FePCa apresentaram diâmetro médio de 745,3 nm como mostrado na figura 8.

Figura 7. Distribuição granulométrica das partículas de fosfato de ferro.

Figura 8. Distribuição granulométrica de partículas de fosfato de ferro-cálcio.

5.1.1.2. Microscopia de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura das partículas de vidros de fosfato mostra que as partículas apresentam forma irregular e tamanho variado, porém com predominâncias das partículas menores. Também, observa-se a tendência de as partículas formarem aglomerados, conforme as figuras 9, 10, 11 e 12.

Figura 9. Partículas de Fosfato de ferro. Aumento de 1000x.

Figura 10. Partículas de Fosfato de ferro. Aumento de 5000x.

Figura 11. Partículas de Fosfato de ferro-cálcio. Aumento de 1000x.

Figura 12. Partículas de Fosfato de ferro-cálcio. Aumento de 5000x.

5.1.1.3. Propriedades Ópticas

5.1.1.3.1. Absorbância

O espectro de absorção da luz polarizada demonstrou que ambos vidros, FeP e FePCa, apresentaram máxima absorbância entre 620 e 630 nm conforme espectros apresentados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13. Absorção de radiação eletromagnética de partículas de fosfato de ferro. A = Absorância e T = Transmitância.

Figura 14. Absorção de radiação eletromagnética de partículas de fosfato de ferro-cálcio. A = Absorância e T = Transmitância.

5.1.1.4. Capacidade de Aquecimento

O teste da capacidade de aquecimento foi realizado com tempo de exposição das partículas de 10 min. As partículas de FeP na concentração de 50 mg/mL mostrou que as partículas proporcionaram uma variação de temperatura de 16,3 °C, na concentração de 250 mg/mL a variação foi de 13,9°C e para a concentração de 500 mg/mL a variação foi de 16,8 °C.

As partículas de FePCa apresentaram variação de temperatura de 13,6 °C para a concentração de 50 mg/mL, 16,1 °C para a concentração de 250 mg/mL e 14,3 °C na concentração de 500 mg/mL. O branco apresentou variação de 1,9 °C conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7: Variação de temperatura de partículas de FeP, FePCa e branco (água destilada) em relação as concentrações das partículas em tempo de exposição de 10 min.

	FeP			FePCa			Branco
Concentração (mg/mL)	50	250	500	50	250	500	
ΔT (°C)	16,3	13,9	16,8	13,6	16,1	14,3	1,9

5.1.1.5. Difração de Raio-X

O difratograma de Raio-X dos vidros de FeP e FePCa não demonstraram presença de picos referentes a fase cristalina nestes materiais, como mostrado nas figuras 15 e 16, respectivamente.

Figura 15. Difratoograma de raios-X do vidro de fosfato de ferro.

Figura 16. Difratoograma de raios-X do vidro de fosfato de ferro-cálcio.

5.1.1.6. Citotoxicidade

5.1.1.6.1. Difusão de extratos em solução

O teste de difusão de extratos dos vidros de FeP e FePCa em solução mostrou que ambos vidros não são tóxicos em nenhuma das concentrações utilizadas, tanto para as células de fibroblastos como para as de Hep2, pois não houve morte celular estatisticamente considerável, apenas no controle positivo como visto nas figuras 17 e 18. Na figura 19 é mostrado foto ilustrativa da placa de 96 poços utilizada no teste.

Figura 17. Teste de difusão de extrato em solução dos vidros de FeP e FePCa com células de fibroblastos; CN = Controle Negativo, CP = Controle Positivo.

Figura 18. Teste de difusão de extrato em solução dos vidros de FeP e FePCa com células de Hep2; CN = Controle Negativo, CP = Controle Positivo.

Figura 19. Placa de teste de difusão de extratos em solução. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo.

5.1.1.6.2. Método de difusão em Agar

No teste de difusão em Agar com os vidros de FeP e FePCa não houve formação de halos ao redor das amostras testadas, tanto para os fibroblastos quanto para a Hep2, apenas ao redor do controle positivo como visto nas figuras 20 e 21.

Figura 20. Teste de difusão em Agar. a) FeP, b) FePCa, c) Controle negativo, d) controle positivo. O círculo e a seta indicam o halo formado devido à morte celular.

Figura 21. Teste de difusão em Agar com Hep2. a) FeP, b) FePCa, c) Controle negativo, d) controle positivo. O círculo e a seta indicam o halo formado devido à morte celular.

5.1.1.7. Histopatologia

Os animais tratados com solução salina via subcutânea (dorso) com volume de 500 μ L nos diferentes tempos (2, 24, 72 horas e 1 semana), apresentaram fibras teciduais organizadas e íntegras, sem infiltrado inflamatório e destruição do parênquima grau 0, como mostra a figura 22A e 23A.

Após a injeção das partículas de fosfato de ferro e fosfato de ferro-cálcio 1g/mL em um volume final de 500 μ L, os tecidos foram retirados após 2, 24, 72 horas e 1 semana. A análise histopatológica os tecidos apresentou estruturas intactas e organizadas, infiltrado

polimórfico e destruição parcial de grau 1, com presença de partículas na lesão até no tempo observado de 1 semana (Figuras 22 e 23 B, C, D e E).

Experimentos com partículas nas doses de 500mg/mL em um volume final de 500µL, também foram realizados. Estes tratamentos apresentaram similaridade com o citado acima, por isso, não foi demonstrado esquematicamente.

Em nenhum dos tratamentos, nas duas concentrações mencionadas, houve lesão tecidual de grau 3.

Figura 22. Cortes histológicos do tecido subcutâneo de camundongos tratados com A) Solução salina; ou 1g/mL de partículas de fosfato de ferro em B) 2 horas; C) 24 horas; D) 72 horas; E) 1 semana; F) Detalhe das partículas no tecido (seta vermelha), células polimórficas (P). Aumento de 10x em (A), (B), (C), (D) e (E) e 40x em (F).

Figura 23. Cortes histológicos do tecido subcutâneo de camundongos tratados com A) Solução salina; ou 1g/mL de partículas de fosfato de ferro-cálcio em B) 2 horas; C) 24 horas; D) 72 horas; E) 1 semana; F) Detalhe das partículas no tecido (seta vermelha), células polimórficas (P). Aumento de 10x em (A), (B), (C), (D) e (E) e 40x em (F).

CAPITULO VI

6. DISCUSSÃO

Os esforços na busca por tratamentos contra o câncer aumentam cada vez mais dentro das Ciências Médicas e Biológicas e esse esforço cada vez mais se torna multidisciplinar ganhando apoio da Física, Química, Engenharia e demais áreas do conhecimento.

A etiologia do melanoma está relacionada com fatores familiares (genéticos) e ambientais. Dentre os fatores ambientais destaca-se a exposição à radiação UV (LeBoit et al, 2006). Dois genes foram descobertos em famílias com histórico de melanoma: CDKN2A (p16) no cromossomo 9p21 e CDK4 no cromossomo 12. Mutações no gene CDKN2A foram encontradas em mais de 25% das famílias com histórico de melanoma no mundo, enquanto mutações no gene CDK4 foram observadas em poucas famílias. O gene CDKN2A/p16 atua como gene supressor de tumor e exerce papel crucial na regulação do ciclo celular e senescência (Bataille, V., 2003).

Cerâmicas bioativas foram descobertas recentemente e desde então seu uso tem dado origem a novas estratégias como materiais artificiais na reparação clínica de ossos e sua substituição. Materiais bioabsorvíveis, os quais se degradam e são absorvidos pelo corpo humano, como vidros de fosfato, são úteis, entre outras aplicações, na liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) (El-Kheshen et al, 2008).

Vidros de FeP e FePCa são solúveis dependendo da concentração de cálcio ou ferro presentes no vidro. A vantagem apresentada por vidros de formulação adequada é o fato de não ser necessária a ressecção cirúrgica dos mesmos por serem solúveis no meio fisiológico. Vidros de fosfato contendo de 0 a 5 mol% de Fe_2O_3 se mostraram biocompatíveis em estudos com mioblastos (Ahmed et al, 2004) e mostraram ausência de resposta imune quando colocados em contato com macrófagos, da mesma forma que a concentração de 48 mol% de CaO não resultou alteração na expressão fenotípica de osteoblastos e fibroblastos (Bitar et al, 2004).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* dos vidros de FeP e FePCa mostraram que estes não foram tóxicos para as células de fibroblastos nem para as células Hep2, empregando-se o

teste de difusão de extratos em solução, levando à viabilidade celular acima de 90%, assim como no método de difusão em Agar não houve formação de halo, como visto nas figuras 6 e 7. Também, os testes *in vivo* demonstraram que as partículas não foram tóxicas para o tecido subcutâneo mesmo no período de 1 semana de tratamento e na dose de 1g/ml, apresentando resposta inflamatória leve e sem morte ou destruição tecidual, como visto nas figuras 10 e 11. O difratograma de Raios X confirmou a estrutura não cristalina de ambos os vidros por não apresentar picos de difração relacionados com estruturas cristalinas. Ambos gráficos apresentam o halo característico de estrutura não cristalina na região de $25^\circ 2\theta$ (figuras 15 e 16).

A análise granulométrica das partículas obtidas pelo método de moagem em moinho de alta energia demonstrou a eficiência do método quanto à obtenção de partículas com pequenos diâmetros. O diâmetro médios obtidos para os vidros de FeP foi de 830,2 nm e para os de FePCa, 745,3 nm, o que pode ser observado pela microscopia eletrônica de varredura onde percebe-se a predominância das partículas de menor tamanho (figuras 6 e 7). A produção de partículas com diâmetro na escala nanométrica é fundamental para auxiliar na difusão das mesmas no tecido e facilitar sua possível internalização pelas células tumorais, o que potencializaria a liberação de calor no meio intracelular.

Os principais fatores fisiológicos que influenciam a resposta de tumores sólidos a hipertermia são: pressão intra tumoral, permeabilidade, pH e pressão de O_2 . Dentre estes, o fluxo sanguíneo é a maior barreira ao tratamento hipertérmico por dissipar o calor permitindo que o tumor e as células estromais associadas sobrevivam (Song et al, 2005). O tratamento hipertérmico de câncer consiste em aquecer as células tumorais a temperaturas entre e 43 e 47°C (Ruiz-Hernández et al, 2006). Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro vem sendo utilizadas no tratamento hipertérmico de células tumorais. Nanopartículas superparamagnéticas biocompatíveis são diretamente injetadas no tecido tumoral onde elas são estimuladas por um campo magnético alternado para produzirem calor devido ao processo de relaxação Browniano e de Néel (Thiesen et al, 2008).

Os testes de absorção da radiação infravermelha e de aquecimento dos vidros de fosfato mostraram sua eficiência uma vez que o branco, contendo apenas água, sofreu pequena variação de temperatura e as amostras apresentaram variação elevada. Ambos vidros utilizados absorveram a radiação infravermelha com pico entre 600-700nm. No entanto, para valores acima de 700nm os vidros também apresentam eficiência, conforme as figuras 13 e 14. Quando submetidos à radiação no comprimento de onda de 660nm, a maior variação de

temperatura apresentada foi para o vidro de FeP na concentração de 500 mg/ml (16,8°C). Porém, para a menor concentração de partículas (50 mg/ml) a variação de temperatura atingiu valor muito próximo do máximo (16,3°C). Para os vidros de FePCa, a maior variação de temperatura ocorreu na concentração de 250 mg/ml (16,1°C), segundo a tabela 7.

O presente projeto demonstrou, até o momento, que a utilização de partículas de FeP e FePCa no tratamento hipertérmico de câncer pode ser viável. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar a eficácia do método e sua eficiência na destruição do tecido tumoral.

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSÃO

O tratamento e combate ao câncer constituem busca contínua crescente e que ganha cada vez mais adeptos e força no meio científico. O câncer se apresenta como uma doença multifacetada, onde vários são os fatores que influenciam a iniciação e promoção das células.

Por se tratar de doença multifatorial e que sabidamente pela literatura envolve mutações em diversos genes presentes nas células, muitas são as frentes pelas quais o problema pode e, talvez, deva ser combatido, onde se engloba o sistema imunológico, vias de segundo mensageiros, radioterapia, tratamento fotodinâmico, laserterapia, entre outros.

No presente trabalho, o método de obtenção das partículas de vidro de fosfato mostrou-se eficiente para a obtenção de quantidade significativa de material na escala do nanômetro. O tamanho obtido das partículas pode auxiliar na sua administração e perfusão tecidual.

Também, os testes de citotoxicidade demonstraram que as partículas são biocompatíveis no tratamento *in vitro* e *in vivo*. Assim como, o experimento da capacidade de aquecimento do material mostrou sua capacidade em obter variação de temperaturas elevadas do solvente. Estes resultados mostram que a utilização de partículas de vidros de fosfato para o tratamento de câncer pode ser viável, assim com seu potencial para utilização no tratamento de melanoma

Entretanto, mais estudos são necessários para averiguar a capacidade de causar morte celular pelas partículas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Não obstante, estudar outras possíveis vias de administração e o acúmulo das partículas nos órgãos vitais.

CAPITULO VIII

8. TRABALHOS FUTUROS

- Teste de solubilidade dos vidros de fosfato em pH neutro, levemente ácido e levemente básico para a verificação da resistência química do material.
- Verificação da citotoxicidade das partículas quando em contato com células de melanoma em testes *in vitro*.
- Teste *in vitro* e *in vivo* para verificação da eficiência das partículas quanto à capacidade de causar morte celular quando sob aplicação de LED com comprimento de onda de 660 nm.

CAPÍTULO IX

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I., COLLINS, C.A., LEWIS, M.P., OLSEN, I., KNOWLES, J.C. Processing, characterization and biocompatibility of iron-phosphate glass fibers for tissue engineering. **Biomaterials**, 25:3223-3232, 2004.

ANTONI, M.H., LUTGENDORF, S.K., COLE, S.W., DHABHAR, F.S., SEPHTON, S.E., MCDONALD, P.G., STEFANEK, M., SOOD, A.K. The influence of biobehavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. **Nat Rev Cancer**, 6(3):240-48, 2006.

ARMSTRONG, B.K., KRICKER, A. How much melanoma is caused by sun exposure? **Melanoma Res.**, 3: 395-401, 1993.

BALCH, C.M., BUZAID, A.C., SOONG, S., ATKINS, M.B., CASCINELLI, N., COIT, D.G., FLEMING, I.D., GERSHENWALD, J.E., HOUGHTON, A.J., KIRKWOOD, J.M., MCMASTERS, K.M., MIHM, M.F., MORTON, D.L., REINTGEN, D.S., ROSS, M.I., SOBER, A., THOMPSON, J.A., THOMPSON, F.J. Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 19, nº. 16, p. 3635-3648, 2001.

BATAILLE, V. Genetic epidemiology of melanoma. **Eur. J. Cancer**, 39: 1341-1347, 2003.

BERRY, D., CRONIN, K., PLEVritis, S., FRYBACK, D., CLARKE, L., et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, 353:1784-92, 2005.

BERWICK, M., ARMSTRONG, B.K., BEN-PORAT, L., FINE, J., KRICKER, A., EBERLE, C., BARNHILL, R. Sun Exposure and Mortality from Melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 97, nº. 3, 2005.

BITAR, M., SALIH, V., MUDERA, V., KNOWLES, J.C., LEWIS, M.P. Soluble phosphate glasses: in vitro studies using human cells of hard and soft tissue origin. **Biomaterials**, 25:2283-2292, 2004.

BYERS, T. Two Decades of Declining Cancer Mortality: Progress with Disparity. **Annual Review of Public Health**, vol. 31, 2010.

CASTREN-PERSONS, M., SCHRODER, T., RAMO, O. J., PUOLAKKAINEN, P., LEHTONEN, E. Contact Nd:YAG laser potentiates the tumor cell killing effect of hyperthermia. **Lasers Surg. Med.**, 11: 595-600, 1991.

CHEN, W. R., ADAMS, R. I., CARUBELLI, R., NORDQUIST, R. E. Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment. **Cancer Letters**, 115: 25-30, 1997.

CHOWDHURY, S., VAUGHAN, M.M., GORE, M.E. New approaches to the systemic treatment of melanoma. **Cancer Treatment Reviews**, 25: 259-270, 1999.

COOPER, D.L., DOUGHERTY, G.J. To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. **Nat. Med.**, 1: 635–637, 1995.

CRAMER, S.F. The origino f epidermal melanocytes. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 115: 115-119, 1991.

CRUZ, A.S., FIGUEIREDO, C.A., IKEDA, T.I., VASCONCELOS, A.C.E., CARDOSO, J.B., SALLES-GOMES, L.F. “Comparação de métodos para testar a citotoxicidade “in vitro” de materiais biocompatíveis”. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, no. 2, p. 153-159, 1998.

DAY, D.E.; RAY, C.S.; MARASINGHE, K.; FANG, X. An alternative host matrix based on iron phosphate glasses for the vitrification of specialized waste forms. Final report submitted to The Environmental Management Science Program – **US. Department of Energy**, p. 1-35, 2000.

DE FABO, E.C., NOONAN, F.P., FEARS, T., MERLINO, G. Ultraviolet B but not Ultraviolet A Radiation Initiates Melanoma. **Cancer Research**, 64: 6372-6376, 2004.

DENNIS, L.K., WHITE, E., LEE, J.A. Recent cohort trends in malignant melanoma by anatomic site in the United States. **Cancer Causes Control**, 4: 93-100, 1993.

DENNIS, L.K. Melanoma incidence by body site: effects of birth-cohort adjustment. **Arch. Dermatol**, 135: 1553-1554, 1999.

DOWSETT, M., DAFFADA, A., CHAN, C.M., JOHNSTON, S.R. Oestrogen receptor mutants and variants in breast cancer. **Eur. J. Cancer**, 33: 1177–1183, 1997.

DUNN, G.P., BRUCE, A.T., IKEDA, H., OLD, L.J., SCHREIBER, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol.**, 3(11):991-98, 2002.

DUNN, G.P., OLD, L.J., SCHREIBER, R.D. The three Es of câncer immunoediting. **Annu Rev Immunol.**, 22:329-60, 2004.

EL-KHESHEN, A.A., KHALIAFA, F.A., SAAD, E.A., ELWAN, R.L. Effect of Al₂O₃ addition on bioactivity, thermal and mechanical properties of some bioactive glasses. **Ceramics International**, 34:1667–1673, 2008.

EL-SAYED, I.H., HUANG, X., EL-SAYED, M.A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. **Cancer Letters**, 239: 129–135, 2006.

ELWOOD, J.M., GALLAGHER, R.P. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. **Int. J. Cancer**, 78: 276-280, 1998.

ESTIMATIVA 2010: Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer**, 2009.

FANG, X.; RAY, C.S.; Day, D.E. "Iron Redox Equilibrium, Structure, and Properties of Iron Phosphate Glasses". **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 283, p. 162-172, 2001.

GARNIS, C., BUYS, T.P.H., LAM, W.L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol cancer**, 3(9): 3-9, 2004.

GAZELLE, G.S., GOLDBERG, S.N., SOLBIATI, L., LIVRAGHI, T. Tumor ablation with radio-frequency energy. **Radiology**, 217: 633-646, 2000.

GIBBS, P., BRADY, B.M.R., ROBINSON, W.A. The Genes and Genetics of Malignant Melanoma. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, p. 229-235, 2002.

GIOVINO, G.A. Epidemiology of tobacco use in the United States. **Oncogene**, 21:7326-40, 2002.

GODLEWSKI, G., MIRO, L., CHEVALIER, T.M., BUREAU, J.P. Experimental comparative study of morphological effects of different lasers on the liver. **Res. Exp. Med.**, 180: 51-57, 1982.

GRICHNIK, J.M., BURCH, J.A., SCHULTEIS, R.D., SHAN, S., LIU, J., DARROW, T.L., VERVAERT, C.E., SEIGLER, H.F. Melanoma, a Tumor based on a Mutant Stem Cell?. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 126, p. 142-153, 2006a.

GRICHNIK, J.M. Genomic instability and tumor stem cells. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 126, p. 1214-1216, 2006b.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(3): 335-343, 2007.

GROSSMAN, D., ALTIERI, D.C. Drug resistance in melanoma: Mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. **Cancer and Metastasis Reviews**, 20: 3-11, 2001.

GUPTA, A.K., GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, 26: 3995-4021, 2005.

HAAR, G.T., COUSSIOS, C. High intensity focused ultrasound: past, present and future. **Int. J. Hyperthermia**, 23: 85-87, 2007a.

HAAR, G.T., COUSSIOS, C. High intensity focused ultrasound: physical principles and devices. **International Journal of Hyperthermia**, 23: 89-104, 2007b.

HAAS, N.K., SMALLEY, K.S.M., HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J. Mol. Histol.**, 35: 309-318, 2004.

HAAS, N.K., SMALLEY, K.S.M., LI, L., HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment cell Res.**, 18: 150-159, 2005.

HAEMMERICH, D., LAESEKE, P.F. Thermal tumour ablation: Devices, clinical applications and future directions. **International Journal of Hyperthermia**, (8) vol. 21, 755-60, 2005.

HANSON, D.F. Fever and the immune response, the effects of physiological temperatures on primary murine splenic T-cell responses in vitro. **J. Immunol.**, 151: 436-48, 1993.

HAUNG, S.K., OKAMOTO, T., MORTON, D.L., HOON, D.S. Antibody responses to melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients. **J Invest Dermatol.**, 111:662–667, 1998.

HAYWARD, N.K. Genetics of melanoma predisposition. **Oncogene**, 22: 3053-3062, 2003.

HEIKE, M., WEINMANN, A., BETHKE, K., GALLE, P.R. Stress protein/peptide complexes derived from autologous tumour tissue as tumor vaccines. **Biochem. Pharmacol.**, 58: 1381-87, 1999.

HIRSCH, L.R., STAFFORD, R.J., BANKSON, J.A., SERSHEN, S.R., RIVERA, B., PRICE, R.E., HAZIE, J.D., HALAS, N.J. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. **PNAS**, 100: 13549-13554, 2003a.

HIRSCH, L. R., JACKSON, J. B., LEE, A., HALAS, N. J., WEST, J. L. A whole blood immunoassay using gold nanoshells. **Anal. Chem.**, 75: 2377-2381, 2003b.

HISATOMI, H., KOHNO, N., WAKITA, K., NAGAO, K., HIRATA, H., HIKIJI, K., HARADA, S. Novel alternatively spliced variant with a deletion of 52 BP in exon 6 of the progesterone receptor gene is observed frequently in breast cancer tissues. **Int. J. Cancer**, 105: 182–185, 2003.

HOBOM, U. Fever therapy revisited. **Br. J. Cancer**, 92: 421-425, 2005.

HOPTION, C.S.A., VAN NETTEN, J.P., VAN NETTEN, C. Dr. William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. **Postgrad. Med. J.**, 79: 672-680, 2003.

ITO, A., TANAKA, K., KONDO, K., SHINKAI, M., HONDA, H., MATSUMOTO, K., ASIDA, T., KOBAYASHI, T. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. **Cancer Sci.**, 94: 308-313, 2003.

JAGER, E., JAGER, D., KNUTH, A. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. **Int. J. Cancer**, 106: 817-20, 2003.

JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. Immunobiology. **Garland Science**, New York, 2001.

JOLESZ, F.A., HYNENEN, K. Magnetic resonance image-guided focused ultrasound surgery. **Cancer J.**, 8: S100-S112, 2002.

JORNEE-DE KORVER, J.G., OOSTERHUIS, J.A., KAKEBEEKE-KEMME, H.M., DE WOLFF-ROENDAAL, D. Transpupillary thermotherapy (TTT) by infrared irradiation of choroidal melanoma. **Doc. Ophthalmol.**, 82: 185-191, 1992.

JORNEE-DE KORVER, J.G., OOSTERHUIS, J.A., VRENSSEN, G.F. Light and electron microscopic findings on experimental melanomas after hyperthermia at 50 degrees C. **Melanoma Res.**, 5: 393-402, 1995.

JORNEE-DE KORVER, J.D., OOSTERHUIS, J.A., DE WOLFF-ROENDAAL, D., KEMME, H. Histopathological findings in human choroidal melanomas after transpupillary thermotherapy. **Br. J. Ophthalmol.**, 81: 234-239, 1997.

KARABULUT, M.; MARASINGHE, G. K.; RAY, C. S.; Day, D. E *et al.* Structural features of iron-phosphate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 222: 144, 1997a.

KARABULUT, M.; MARASINGHE, G. K.; RAY, C. S.; Day, D. E *et al.* An Investigation of the Local Iron Environment in Iron Phosphate Glasses having Different Fe(II) Concentrations. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 306, p.182-192, 2002b.

KARASARIDES, M., CHILOECHES, A., HAYWARD, R., DUVAZ-NICULESCU, D., SCANLON, I., FRIEDLOS, F., OGILVIE, L., HEDLEY, D., MARTIN, J., MARSHALL, C.J., SPRINGER, C.J., MARAIS, R. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. **Oncogene**, 23: 6292–6298, 2004.

KIM, C. W.; DAY, D. E. Iron phosphate glasses for vitrifying DOE high priority nuclear wastes. Environmental and Waste Management: Advancements through the Environmental Management Science Program. **American Chemical Society**, Anaheim, 2004.

KLUGER, M.J. The evolution and adaptive value of fever. **Am. Sci.**, 66: 38-43, 1978.

KNOWLES, J.C., FRANKS, K., ABRAHAMMS, I. Investigation of the solubility and ion release in the glass system K₂O-Na₂O-CaO-P₂O₅. **Biomaterials**, 22(23):3091-6, 2001.

KOSTENICH, G., BABUSHKINA, T., MALIK, Z., ORENSTEIN, A. Photothermic treatment of B16 melanoma using a broadband pulsed light delivery system. **Cancer Letters**, 157: 161-168, 2000.

KRAYBILL, W.G., OLENKI, T., EVANS, S.S., OSTBERG, J.R., O'LEARY, K.A., GIBBS, J.F., REPASKY, E.A. A phase I study of fever-range whole body hyperthermia (FR-WBH) in patients with advanced solid tumours: correlation with mouse models, **Int. J. Hyperthermia**, vol. 18, n°. 3, p. 253-266, 2002.

KUMAR, V., ABBAS, A., FAUST, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7ª edição, Elsevier Editora Ltda, 2005. 1504 p.

LADNER, K.J., GUTTRIDGE, D.C., BOUCHARD, P., CARSON III, W.E. IFN- α and Bortezomib Overcome Bcl-2 and Mcl-1 Overexpression in Melanoma Cells by Stimulating the Extrinsic Pathway of Apoptosis. **Cancer Res.**, 68 (20): 8351-8360, 2008.

LANDS, S.H., MURRAY, T., BOLDEN, S., WINGO, P.A.. Cancer statistics. **Cancer J. Clin.**, 49, 8–31, 1999.

LEBOIT, P.E., BURG, G., WEEDON, D., SARASIN, A. Pathology and Genetics of Skin Tumours. **World Health Organization Classification of Tumours, International Agency for Research on Cancer**, IARC Press, 2006.

LEE, G., IKEDA, R.M., CHAN, M.C., LEE, M.H., RINK, J.L., REIS, R.L., THEIS, J.H., LOW, R., BOMMER, W.J., KUNG, A.H., HANNA, E.S., MASON, D.T. Limitations, risk and complications of laser recanalization: a cautious approach warranted. **Am. J. Cardiol.**, 56: 181-185, 1985.

LESINSKI, G.B., RAIG, E.T., GUENTERBERG, K., BROWN, L., GO, M.R., SHAH, N.N., LEWIS, A., QUIMPER, M., HADE, E., YOUNG, G., CHAUDHURY, A.R., LI, J., WANG, L., LIU, X., ZHANG, Z., GUO, H., LIU, W., TANG, S. In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. **Cancer Letters**, 274: 319-326, 2009.

LI, J., WANG, L., LIU, X., ZHANG, Z., GUO, H., LIU, W., TANG, S. *In vitro* cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. **Cancer Letters**, 274: 319-326, 2009.

LIU, D.L., ANDERSSON-ENGELS, S., STURESSON, C., SVANBERG, K., HÅKANSSON, C.H., SVANBERG, S. Tumour vessel damage resulting from laser-induced hyperthermia alone and in combination with photodynamic therapy. **Cancer Letters**, 111: 157-165, 1997.

LIU, X., GUO, Y. Effects of Nd: YAG laser-heated metal cap on human platelets *in vitro*. In: International Conference on Photodynamic Therapy and Laser Medicine, 1993, J. Li. Ed. **Proc. SPIE**, 1616:563-569.

LIU, H.X., CARTEGNI, L., ZHANG, M.Q., KRAINER, A.R. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. **Nat. Genet.**, 27: 55–58, 2001.

LUCAS, R., MCMICHAEL, T., SMITH, W., ARMSTRONG, B. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. **Environmental Burden of Disease Series**, n°. 13, World Health Organization, 2006.

LUGER, T.A., SCHOLZEN, T., GRABBE, S. The role of alpha melanocyte stimulating hormone in cutaneous biology. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2: 87-93, 1997.

MATTICK, J.S. The human genome and the future of medicine. **Med. J. Aust.**, 179: 212–216, 2003.

M. SABATINO et al. Stem cells in melanoma development. **Cancer Letters**, 2009. doi: 10.1016/j.canlet.2008.10.039.

MARTIN, S.W. Review of the Structures of Phosphate Glasses. **Eur. J. St. Inor. Chem.**, 28, 163-205, 1991.

MARTÍNEZ, J.L.S., MORALES, C.M.C., ORTEGA, S.S., ÁNGEL, M. Mutation and homozygous deletion analyses of genes that control the G1/S transition of the cell cycle in skin melanoma: p53, p21, p16 and p15. **Clin. Transl. Oncol.**, vol. 7, n°. 4, p. 156-164, 2005.

MATTICK, J.S. RNA regulation: a new genetics?, **Nat. Rev. Genet.**, 5: 316–323, 2004.

MENSEL, B., WEIGEL, C., HOSTEN, N. Laser-induced thermotherapy. **Recent Results Cancer Res.**, 167: 69-75, 2006.

MIRZA, A.N., FORNAGE, B.D., SNEIGE, N., KUERER, H.M., NEWMAN, L.A., AMES, F.C., SINGLETARY, S.E. Radiofrequency ablation of solid tumors. **Cancer J.**, 7: 95-102, 2001.

MOKDAD, A., BOWMAN, B., FORD, E., VINICOR, F., MARKS, J., KOPLAN, J. The continuing epidemic of obesity and diabetes in the United States. **JAMA**, 286:1195–200, 2001.

MOLLS, M. Hyperthermia: the actual role in radiation oncology and future prospects. **Strahlenther. Oncol.**, 168: 183-190, 1992.

NIELSEN, O.S., HORSMAN, M., OVERGAARD, J. A future for hyperthermia in cancer treatment?. **Eur. J. Cancer**, 37:1587–1589, 2001.

NIEMZ, M.H. Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications. **Springer-Versalag**, Berlim, 1996.

NOVELLINO, L., CASTELLI, C., PARMIANI, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. **Cancer Immuno. Immunother.**, 54: 187-207, 2005.

ODOUX, C., FOHRER, H., HOPPO, T., GUZIK, L., STOLZ, D.B., LEWIS, D.W., GOLLIN, S.M., GAMBLIN, T.C., GELLER, D.A., LAGASSE, E. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. **Cancer Res.**, 68:6932-6941, 2008.

OHARA, M., KAWASHIMA, Y., KATOH, O., WATANABE, H. Blue Light Inhibits the Growth of B16 Melanoma Cells. **Jpn. J. Cancer Res.**, 93: 551-558, 2002.

OLDENBURG, S. J., JACKSON, J. B., WESTCOTT, S. L., HALAS, N. J. Infrared extinction properties of gold nanoshell. **Appl. Phys. Lett.**, 111: 2897, 1999.

O'NEAL, D. P., HIRSCH L. R., HALAS, N. J., PAYNE, J. D., WEST, J. L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. **Cancer Letters**, 209: 171-176, 2004.

PANDOLFI, P.P. Aberrant mRNA translation in cancer pathogenesis: an old concept revisited comes finally of age. **Oncogene**, 23: 3134–3137, 2004.

PARKER, R., SONG, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 11: 121–127, 2004.

PARRISH, J.A., WILSON, B.C. Current and future trends in laser medicine. **Photochem. Photobiol.**, 53: 731-738, 1991.

PENG, Y.B.; DAY, D.E. High thermal expansion phosphate glasses. **Glass Technology**. v. 32, p. 166-173, 1991.

PHILIPP, C. M., ROHDE, E., BERLIEN, H. P. Nd:YAG laser procedures in tumor treatment. **Semin. Surg. Oncol.**, 11: 290-298, 1995.

QUEIROLO, P., ACQUATI, M. Targeted therapies in melanoma. **Cancer Treatment Reviews**, 32: 524-531, 2006.

RATH, T. Malignant melanoma. **European Surgery**, 38/2: 145-148, 2006.

RAY, C.S.; FANG, X.; KARABULUT, M.; MARASINGHE, G.K; DAY, D.E. Effect of melting temperature and time on iron valence and crystallization of iron phosphate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 249, p.1-16, 1999.

REDONDO, P., LLORET, P., ANDREU, J., INOGES, S. Imatinib mesylate in cutaneous melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, 123: 1208-1209, 2004.

REIS, S.T.; KARABULUT, M.; DAY, D.E. Structural features and properties of lead-iron-phosphate nuclear wasteforms. **Journal of Nuclear Materials**, v. 304, p. 87-95, 2002a.

REIS, S.T.; FARICA, D.L.A.; MARTINELLI, J.R.; PONTUSCHKA, W.A.; DAY, D.E.; PARTITI, C.S.M. Structural Features of Lead Iron Phosphate Glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 304, 188-94, 2002b.

REINHOLD, H.S., ENDRICH, B. Tumor microcirculation as a target for hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, 2: 111-137, 1986.

REYA, T., MORRISON, S.J., CLARKE, M.F., WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, 414:105-111, 2001.

RITOSSA, P. Problems of prophylactic vaccinations of infants. **Riv. Ist. Sieroter. Ital.**, 37: 79-108, 1962.

ROCHA, J.C.C., SILVA, S.N. Oncogenética. In: Coelho FRG, Kowalski LP. **Bases da Oncologia**. 2. ed., São Paulo: TECMEDD, p. 423-32, 2003.

ROMERO-GRAILLET, C., ABERDAM, E., CLEMENT, M., et al. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. **J. Clin. Invest.**, 99: 635-642, 1997.

RUIZ-HERNÁNDEZ, E., SERRANO, M.C., ARCOS, D., VALLET-REGÍ, M. Glass-glass ceramic thermoseeds for hyperthermic treatment of bone tumors. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 533-543, 2006.

RUSTHOVEN, J.J. The Evidence for Tamoxifen and Chemotherapy as Treatment for Metastatic Melanoma. **European Journal of Cancer**, vol. 34, Suppl. 2, p. S31-S36, 1998.

SABATINO, M., STRONCEK, D., KLEIN, H., MARINCOLA, F. M., WANG, E. Stem cells in melanoma development. **Cancer Letters**, doi:10.1016/j.canlet.2008.10.039, 2009.

SAENGER, Y.M., LI, Y., CHIOU, K.C., CHAN, B., RIZZUTO, G., TERZULLI, S.L., MERGHOU, T., HOUGHTON, A.N., WOLCHOK, J.D. Improved Tumor Immunity Using Anti-Tyrosinase Related Protein-1 Monoclonal Antibody Combined with DNA Vaccines in Murine Melanoma. **Cancer Res.**, 68 (23): 9984-9891, 2008.

SALES, B.C., BOATNER, L.A. Lead-Iron Phosphate Glass: A Stable Storage Medium for High-Level Nuclear Waste. **Science**, v. 226, p. 45-48, 1984.

SCHOLZOVÁ, E., MALÍK, R., ŠEVČÍK, J., KLEIBL, Z. RNA regulation and cancer development. **Cancer Letters**, 246: 12–23, 2007.

SEKI, T., WAKABAYASHI, M., NAKAGAWA, T., IMAMURA, M., TAMAI, T., NISHIMURA, A., YAMASHIKI, N., OKAMURA, A., INOUE, K. Percutaneous microwave coagulation therapy for patients with small hepatocellular carcinoma: comparison with percutaneous ethanol injection therapy. **Cancer**, 85: 1694-1702, 1999.

SGHAIER, H., LE AI, T.H., HORIIKE, T., SHINOZAWA, T. Molecular chaperones: proposal of a systematic computer-oriented nomenclature and construction of a centralized database. **In Silico Biol.**, 4: 311-22, 2004.

SIMON, C.J., DUPUY, D.E., MAYO-SMITH, W.W. Microwave ablation: principles and applications. **Radiographics**, 25: S69-S83, 2005.

SKANES, A.C., KLEIN, G., KRAHN, A., YEE, R. Cryoablation: potentials and pitfalls. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, 15: S28-S34, 2004.

SLAPER, H., VELDEERS, G.J., DANIEL, J.S., DE GRUIJL, F.R., VAN DER LEUN, J.C. Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna Convention achievements. **Nature**, 384: 256-258, 1996.

SMYTH, M.J., SWANN, J., CRETNEY, E., ZERAFA, N., YOKOYAMA, W.M., HAYAKAWA, Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. **J Exp Med.**, 202(5):583-88, 2005.

SONG, C.W., PARK, H.J., LEE, C.K., GRIFFIN, R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. **Int. J. Hyperthermia**, 21(8):761–767, 2005.

SPENCE, R.A.J., JOHNSTON, P.G. **Oncologia**, Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2003.

STAMM, S., ARI, S.B., RAFALSKA, I., TANG, Y., ZHANG, Z., TOIBER, D. THANARAJ, T.A., SOREQ, H. Function of alternative splicing. **Gene**, 344: 1–20, 2005.

STECCA, B., MAS, C., CLEMENT, V., ZBINDEN, M., CORREA, R., PIGUET, V., BEERMANN, F., ALTABA, A.R. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. **PNAS**, vol. 104, n° 14, p. 5895-5900, 2007.

STONELEY, M., WILLIS, A.E. Aberrant regulation of translation initiation in tumorigenesis. **Curr. Mol. Med.**, 3: 597–603, 2003.

SWEETLAND, H.M., WYMAN, A., ROGERS, K. Evaluation of the effect on normal liver of interstitial laser hyperthermia using artificial sapphire probes. **Lasers Med. Sci.**, 8: 99-105, 1993.

TAFRA, L., DALE, P.S., WANEK, L.A. Resection and adjuvant immunotherapy for melanoma metastatic to the lung and thorax. **J Thora. Cardiovasc. Surg.**, 110:119–129, 1995.

TAMURA, Y., PENG, P., LIU, K. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. **Science**, 278:117–120, 1997.

THIESEN, B., JORDAN, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, 24(6): 467-474, 2008.

THOMPSON, I., GOODMAN, P., TENGGEN, C., LUCIA, M., MILLER, G., et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. **N. Engl. J. Med.**, 349:215–24, 2003.

TONG, L., LOU, J., XU, Y., LUO, Q., SHEN, N., MAZUR, E. Highly Nd³⁺-doped Y₃Al₅O₁₂ crystal fiber tip for laser thermotherapy. **Applied Optics**, vol. 41, 19:4008-4012, 2002a.

TONG, L., ZHU, D., LUO, Q., HONG, D. A Laser Pumped Nd 3 + doped YAG FiberOptic Thermal Tip for Laser Thermotherapy. **WileyLiss, Inc**, 2002b.

TORREZINI, T., ATHANAZIO, D.A. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 54(1): 63-77, 2008.

TUCKER, M.A., GOLDSTEIN, A.M. Melanoma etiology: where are we?. **Oncogene**, 22: 3042-3052, 2003.

VAN DER ZEE, J. Heating the patient: a promising approach?. **Annu. Oncol.**, 13: 1173-84, 2002.

VAN WAZER, J.R. Phosphorous and its Compounds. **Interscience**, vol. 1, 1958, New York.

VARSHNEYA, A.K. **Fundamentals of inorganic glass**. Academic Press (ed), 1994, San Diego.

VEIEROD, M.B., WEIDERPASS, E., THORN, M., HANSSON, J., LUNDE, E., ARMSTRONG, B., ADAMI, H.O. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. **J. Natl. Cancer Inst.**, 95: 1530-1538, 2003.

VERDAASDONK, R.M., VANDERTOP, A.W., VAN SWOL, C.F. “Laser-assisted neuroendoscopy using Nd:YAG and diode contact laser with black fiber tips”. In: Lasers in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems VII, R. ANDERSON, K.E.B., BASS, L.S., GREGORY, K.W., HARRIS, D.M., LUI, H., MALEK, R.S., MUELLER, G.J., PANKRATOV, M.M., PERLMUTTER, A.P., REIDENBACH, H., TATE, L.P., WATSON, G.M., eds., **Proc. SPIE**, 2970, 591–598, 1997.

WAGNER, R.I., MOSKALIK, K.G., KOZLOV, A.P. Comparative evaluation of the effectiveness of surgical treatment and pulsed laser therapy for malignant skin melanoma, stage I. **Vopr. Oncol.**, 42: 98-100, 1996.

WALDOW, S. M., MORRISON, P. R., GROSSWEINER, L. I. Nd:YAG laser-induced hyperthermia in a mouse tumor model. **Lasers Surg. Med.**, 8: 510-514, 1988.

WALDOW, S.M., RUSSEL, G.E., WALLNER, P.E. Microprocessorcontrolled Nd:YAG laser for hyperthermia induction in the RIF-1 tumor. **Lasers Surg. Med.**, 12: 417-424, 1992.

WEYERS, W., EULER, M., DIAZ-CASCAJO, C., SCHILL, W.B., BONCZKOWITZ, M. Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. **Cancer**, 86, 288–299, 1999.

WILLS, J., FINLAY, J.M., MCMANUS, J.P.A. Effect of hyperthermia therapy on the liver: morphological observations. **J. Clin. Pathol.**, 29: 1-10, 1976.

WILUSZ, C.J., WORMINGTON, M., PELTZ, S.W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 2: 237–246, 2001.

ZHANG, Y., ZAN, Y., SHAN, M., LIU, C., SHI, M., LI, W., ZHANG, Z., LIU, N., WANG, F., ZHONG, W., LIAO, F., GAO, G.F., TIEN, P. Effects of heat shock protein gp96 on human dendritic cell maturation and CTL expansion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 344: 581-87, 2006.

ZHANG, H.G., MEHTA, K., COHEN, P., GUHA, C. Hyperthermia on immune regulation: A temperature's story. **Cancer Letters**, 271: 191-204, 2008.

WOOLARD, J., WANG, W.Y., BEVAN, H.S., QIU, Y., MORBIDELLI, L., PRITCHARD-JONES, R.O., CUI, T., SUGIONO, M., WAINE, E., PERRIN, R., FOSTER, R., DIGBY-BELL, J., SHIELDS, J.D., WHITTLES, C.E., MUSHENS, R.E., GILLATT, D.A., ZICHE, M., HARPER, S.J., BATES, D.O. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. **Cancer Res.**, 64: 7822–7835, 2004.

WORLD CANCER RES. FUND/AM. INST. CANCER PREV. **Policy and Action for Cancer Prevention. Food, Nutrition, and Physical Activity: A Global Perspective.** Washington, DC: AICR, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report**, 2008, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 45/2007

Londrina, 07 de agosto de 2007.

Prezada Pesquisadora

O CEEA/UEL, reunido aos 08 de maio do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado **"Ação de biomoléculas antioxidantes na prevenção da lesão de células da pele de camundongos expostos à irradiação UVB"**, registrado no CEEA sob o nº 08/07, processo nº 38780/06, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados e encaminhado o Formulário de Encaminhamento corrigido, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Cumprir orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa
Coordenador do CEEA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani
Coordenadora do Projeto
Departamento de Ciências Patológicas
Centro de Ciências Biológicas

Cópia para Profa. Ivone Yurika Mizubuti (Chefe da DCA/PROPPG)